



Etude du rôle et de la régulation de BubR1 dans la ségrégation des chromosomes acentriques

Nicolas Derive

► To cite this version:

Nicolas Derive. Etude du rôle et de la régulation de BubR1 dans la ségrégation des chromosomes acentriques. Génétique. Université de Bordeaux, 2014. Français. NNT : 2014BORD0256 . tel-01158444

HAL Id: tel-01158444

<https://theses.hal.science/tel-01158444>

Submitted on 1 Jun 2015

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THÈSE

pour l'obtention du

DIPLÔME NATIONAL DE DOCTORAT DÉLIVRÉ PAR L'UNIVERSITÉ DE BORDEAUX

École doctorale Sciences de la vie et de la santé

Mention : Sciences, Technologies, Santé

Option : Génétique

Présentée et soutenue publiquement

Le 05/12/2014

Par Nicolas DERIVE

Membres du jury

Martin TEICHMANN

PR Université de Bordeaux, Institut Européen de Chimie et de Biologie, Pessac / *président du jury*

Jean-Paul JAVERZAT

DR2 CNRS, UMR 5095 CNRS/Institut de Biochimie et Génétique Cellulaires, Bordeaux / *examineur*

Zohra RAHMANI

CR1 CNRS, HDR, Institut Jacques Monod, UMR 7592 CNRS/Université Paris Diderot, Paris / *rapporteur*

Benjamin LOPPIN

DR2 CNRS, CGphiMC/Université Claude Bernard Lyon 1, Lyon / *rapporteur*

Anne ROYOU

CR1 CNRS, Institut Européen de Chimie et Biologie UMR 5095 CNRS/Institut de Biochimie et Génétique Cellulaire, Pessac / *directrice de thèse*

**Etude du rôle et de
la régulation de
BubR1 dans la
ségrégation des
chromosomes
acentriques**

REMERCIEMENTS

J'adresse pour commencer mes remerciements au docteur Anne Royou, pour m'avoir encadré, accompagné et beaucoup appris au cours de ma thèse.

Je remercie également les docteurs Zohra Rahmani, Benjamin Loppin, Jean-Paul Javerzat et le professeur Martin Teichmann pour m'avoir fait l'honneur d'accepter de juger mes travaux de thèse.

Merci à toute l'équipe, passée et présente, à Marie-Charlotte, à Nabila, à Lou, à Priscilla, aux deux Cédric, et en particulier aux docteurs Emilie Montembault pour son aide et ses corrections et Damien Goutte-Gattat pour l'aide, les corrections et les discussions constructives du soir !

Merci à ma Virginia, à ma famille, à mes parents, à ma sœur, et à Cécile pour leur soutien de tous les instants, leurs conseils.

Merci également à tous mes amis, qui m'ont supporté (et ont aussi supporté mes absences !) pendant cette période, et j'ai conscience que ça n'a pas toujours été facile.

Merci à Anne et Dora pour leurs conseils avisés.

Merci enfin à Giorgio et à Céline, qui, même loin, m'ont prodigué d'utiles avis.

« Dans la vie, rien n'est à craindre, tout est à comprendre »

Marie Skłodowska-Curie

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION.....	1
1) GENERALITES SUR LE CYCLE CELLULAIRE ET LA MITOSE.....	2
2) CONTROLE DE L'ENTREE ET DE LA SORTIE DE MITOSE.....	4
A) ENTREE EN MITOSE SOUS LE CONTROLE DU COMPLEXE CYCLINE B-CDK1	4
B) SORTIE DE MITOSE : LE ROLE DE L'APC/C	9
3) LES KINETOCHORES.....	10
A) DESCRIPTION DES KINETOCHORES	10
B) ATTACHEMENT DES KINETOCHORES AUX MICROTUBULES DU FUSEAU MITOTIQUE.....	11
4) LE POINT DE CONTROLE DE L'ASSEMBLAGE DU FUSEAU MITOTIQUE. 13	13
A) DEFINITION DU POINT DE CONTROLE	13
B) MISE EN PLACE DU POINT DE CONTROLE	15
C) INACTIVATION DU POINT DE CONTROLE.....	18
5) LA FONCTION ET LA REGULATION DE BUBR1 EN MITOSE	21
A) LES FONCTIONS DE BUBR1 EN MITOSE.....	21
B) LES REGULATIONS DE BUBR1 EN MITOSE	25
6) LES DOMMAGES A L'ADN ET LEUR REPARATION	28
A) LES DIFFERENTES LESIONS DE L'ADN EXISTANTES	28
i. <i>Les mutations ponctuelles.....</i>	28
ii. <i>Les cassures double brin.....</i>	29
B) LE POINT DE CONTROLE DES DOMMAGES A L'ADN.....	30
i. <i>Mise en place du point de contrôle des dommages à l'ADN en G2/M.....</i>	31
ii. <i>Régulation de la réparation de l'ADN par le point de contrôle.....</i>	33
iii. <i>Récupération à la suite de la réparation des dommages.....</i>	34
iv. <i>Adaptation au point de contrôle.....</i>	35
C) LES DIFFERENTES VOIES DE REPARATION DES CASSURES DOUBLE BRIN	37
i. <i>La recombinaison homologue (HR).....</i>	39
ii. <i>La jonction des extrémités non-homologues</i>	40
iii. <i>L'hybridation simple brin</i>	41
D) LA REPARATION DES DOMMAGES A L'ADN EN MITOSE	42
7) OBJECTIFS DE THESE.....	47
MATERIEL ET METHODES.....	49
1) MATERIELS ET METHODES DE L'ARTICLE 1.....	50
A) SOUCHES DE DROSOPHILE UTILISEES.....	50
B) CLONAGE DES CONSTRUCTIONS BUBR1 TRONQUÉES	50
C) CONSTRUCTION DES PLASMIDES DU SUBSTRAT SYNTHETIQUE DE L'APC/C.....	52
D) EXTRACTION DE L'ADN GENOMIQUE CODANT BUB3.....	53
E) CLONAGE DES CONSTRUCTIONS BUB3	53
F) CLONAGE DES CONSTRUCTIONS GFP-SECURINE ET SECURINE-GFP	55
G) WESTERN BLOTS	56
2) MATERIELS ET METHODES COMPLEMENTAIRES	57
A) TESTS DE LA LETALITE SYNTHETIQUE INDUITE PAR UNE MUTATION EN CONTEXTE D'INDUCTION DE CASSURES DOUBLE BRIN AVEC I-CRE.....	57

B) GÉNÉRATION DES CONSTRUCTIONS BUBR1 MUTEES DANS LE DOMAINE KARD	59
C) CALCUL DE L'INDEX MITOTIQUE SUR LES NEUROBLASTES ISSUS DE CERVEAUX DE LARVES DE TROISIEME STADE	60
D) GÉNÉRATION D'UNE CONSTRUCTION BUBR1 ETIQUETEE DENDRA2 SOUS CONTROLE DU PROMOTEUR ENDOGENE.....	62
E) ÉTUDE DE LA SEGREGATION DES CHROMOSOMES ACENTRIQUES ET DE LA DYNAMIQUE DE LOCALISATION DE CONSTRUCTIONS DANS DIFFERENTS MUTANTS	63
RESULTATS	66
1) RESULTATS DE L'ARTICLE 1	67
A) RESUME DE L'ARTICLE.....	67
2) RESULTATS COMPLEMENTAIRES.....	114
A) LA MUTATION DE L'HELICASE MUS309 (BLM) ENTRAINE UNE LETALITE SYNTHETIQUE AVEC I-CREI	114
B) LA MUTATION PHOSPHOMIMETIQUE DU MOTIF KARD DE BUBR1 INDUIT UN ARRET EN MITOSE DEPENDANT DU POINT DE CONTROLE DE L'ASSEMBLAGE DU FUSEAU MITOTIQUE (SAC)	117
C) LE DOMAINE KAN DE BUBR1 INTERVIENT DANS LA SEGREGATION CORRECTE DES CHROMOSOMES ACENTRIQUES, MAIS PAS DANS LEUR VITESSE DE SEGREGATION	119
D) LA MUTATION DU DOMAINE KAN ENTRAINE UNE PERTE PARTIELLE DE LA LOCALISATION DE Fzy (Cdc20) AU TETHER	121
CONCLUSION, DISCUSSION ET PERSPECTIVES	124
1) DISCUSSION ET PERSPECTIVES.....	125
A) LA REGULATION DES ACTEURS DU TETHER.....	125
i. <i>L'interaction BubR1-Bub3 et le rôle de Bub3</i>	125
ii. <i>Autres interactants au tether</i>	125
iii. <i>Généralisation à un autre modèle</i>	126
iv. <i>Dynamique de BubR1 au tether</i>	126
v. <i>Rôle de la phosphorylation du domaine KARD de BubR1</i>	127
vi. <i>Rôle de l'acétylation de BubR1 au tether</i>	128
B) LE ROLE DE BUBR1 AU TETHER.....	129
C) MUS309 ET LA RECHERCHE DU MECANISME DE REPARATION DES CASSURES INDUITES PAR I-CREI	131
2) CONCLUSION GENERALE	132
ANNEXES	133
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	137

LISTE DES ABRÉVIATIONS

APC/C : *Anaphase Promoting Complex/Cyclosome*

BER : *Base Excision Repair*

Bub : *Budding Uninhibited by Benzimidazole*

CCAN : *Constitutive Centromere Associated Network*

CPC : *Chromosomal Passenger Complex*

DDR : *DNA Damage Response*

DR : *Direct Repair ou Direct Reversal*

EMS : *Ethyl MethaneSulfonate*

EXO1 : *exonucléase 1*

FoxM1 : *Forkhead box protein M1*

HDAC : *Histones déacétylases*

KARD : *Kinetochore Attachment Regulatory Domain*

KD : *Kinase Dead*

MAD : *Mitotic Arrest Deficient*

MCC : *Mitotic Checkpoint*

MIM : *Mad2 Interaction Motif*

MMR : *Mismatch Repair*

MPF : *Mitosis Promoting Factor* (également appelé *Maturation Promoting Factor*)

MRS : *Mre11-Rad50-Nbs1*

NEBD : *Nuclear Envelope Break Down*

NER : *Nucleotide Excision Repair*

NHEJ : *Non Homologous End Joining*

Plk1 : *Polo-like kinase 1*

RH (ou HR) : *Recombinaison Homologue (Homologous Recombination)*

ROS : *Reactive Oxygen Species*

SAC : *Spindle Assembly Checkpoint*

SSA : *Single Strand Annealing*

UFB : *Ultra Fine Bridges*

Introduction

1) Généralités sur le cycle cellulaire et la mitose

Le cycle cellulaire est le processus qui, à partir d'une cellule mère, va donner deux cellules filles génétiquement identiques. Chez les unicellulaires il a lieu quand les conditions de croissance sont favorables, alors que les organismes multicellulaires, au fur et à mesure de leur complexification, sont parvenus à s'affranchir en partie de ce critère pour le remplacer par des régulations protéiques, comme les cytokines. Ce cycle est composé de quatre étapes. L'ensemble des trois premières étapes constitue l'interphase qui se décompose en une première étape de croissance cellulaire appelée G1, suivie d'une étape de réplication de l'ADN nucléaire appelée S, puis d'une seconde étape de croissance cellulaire appelée G2. Cet ensemble appelé interphase est suivi de la mitose. La mitose est l'étape durant laquelle la cellule se divise pour produire deux cellules filles au contenu génétique identique.

Ces étapes vont se répéter jusqu'à la différenciation de la cellule ou son entrée en sénescence ; elles sont contrôlées notamment par des complexes contenant une kinase (de la famille Cdk) et un régulateur de celui-ci, une Cycline. Ces différents régulateurs participent à un ensemble de points de contrôle (ou checkpoints) assurant que ces étapes se déroulent correctement ; nous nous intéresserons à certains d'entre eux dans la suite de cette introduction (cf. partie Contrôle de l'entrée et de la sortie de mitose).

La mitose est constituée de cinq phases : la prophase, la prométaphase, la métaphase, l'anaphase et la télophase (voir Figure 1). Nous décrirons ici le cas de la mitose ouverte (avec rupture de l'enveloppe nucléaire), qui est le type de mitose survenant dans notre modèle, *Drosophila melanogaster*.

La prophase est caractérisée par la condensation de la chromatine, on peut alors commencer à visualiser l'individualisation des chromosomes. Les chromatides sœurs vont être attachés ensemble par un complexe protéique formant des anneaux autour d'elles, les cohésines. Les nucléoles disparaissent.

La prométaphase correspond à l'étape durant laquelle l'enveloppe nucléaire se rompt. Les protéines cytoplasmiques diffusent alors librement autour de la

chromatine. C'est à cette étape que les kinétochores s'assemblent sur une zone particulière de chaque chromosome appelée centromère (cf partie Attachement des kinétochores aux microtubules du fuseau mitotique). A ce moment le fuseau mitotique, constitué de microtubules, commence à se former depuis les pôles et une structure appelée centrosome, alors mature. Il se fixe de manière bi-orientée (amphitélisque) aux kinétochores. Les centrosomes, constitués notamment de deux centrioles orthogonaux chacun et de matériel péri-centriolaire, sont les principaux centres organisateurs des microtubules (MTOC) des eucaryotes supérieurs (Nigg, 2007).

Lors de la métaphase, les microtubules du fuseau mitotique déplacent les chromosomes de façon à ce qu'ils soient tous alignés sur la plaque métaphasique, à l'équateur de la cellule. La qualité de la liaison des microtubules aux kinétochores est contrôlée par le point de contrôle de l'assemblage du fuseau mitotique (*Spindle Assembly Checkpoint* (SAC), cf. partie Le point de contrôle de l'assemblage du fuseau mitotique). Celui-ci est en mesure de bloquer la cellule en métaphase jusqu'à l'attachement correct, dit amphitélisque (chaque kinétochore de chaque chromatide sœur est relié à un des deux pôles de la cellule), de tous les chromosomes.

Durant l'anaphase, chacune des deux chromatides sœurs constituant chaque chromosome ségrège, sous l'effet de traction des microtubules et du retrait des cohésines, vers un des pôles opposés de la cellule. Cela permet ainsi l'obtention de deux groupes de chromosomes identiques, cette étape est nommée anaphase A. Puis les pôles s'éloignent l'un de l'autre et un fuseau central de microtubules se constitue à l'équateur de la cellule, c'est l'anaphase B.

La télophase est la dernière étape de ce processus. Elle est marquée par la séparation physique des deux cellules filles. La membrane nucléaire se reforme autour de chaque groupe de chromosomes, et les chromosomes se décondensent. La membrane s'invagine et un anneau contractile scinde la cellule en deux au niveau de l'équateur : c'est la cytokinèse, permettant d'obtenir deux cellules filles individualisées.

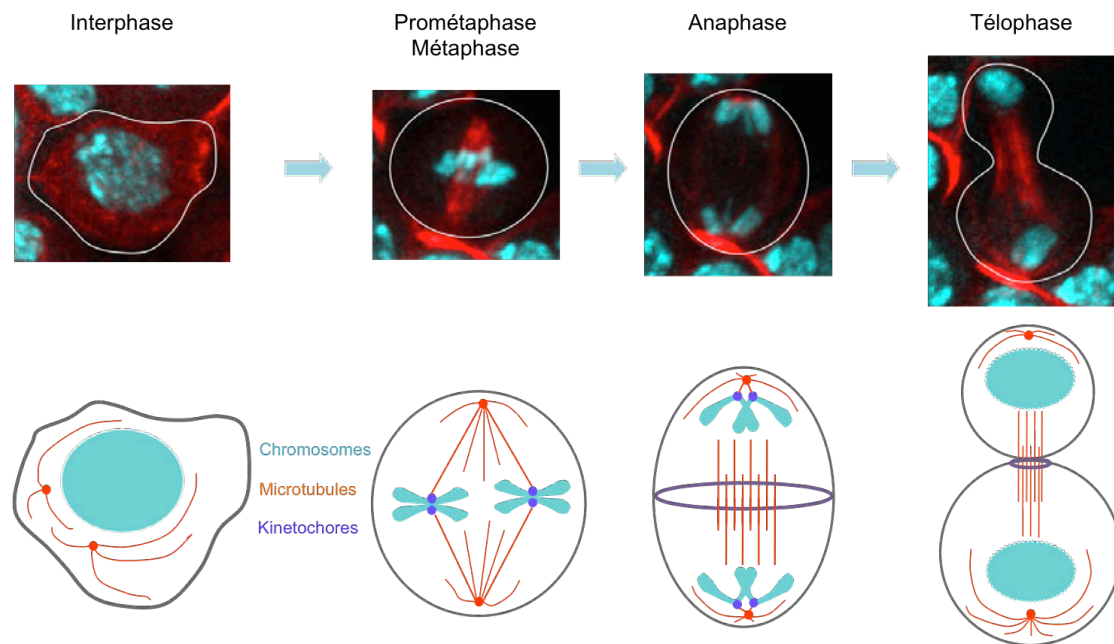


Figure 1 : Différentes étapes de la mitose observées sur neuroblastes de drosophile exprimant de la tubuline (en rouge, marquant les microtubules) et de l'histone H2Ax fluorescentes (en cyan) en haut, et représentations schématiques de ces étapes de la mitose (photos de A. Royou). Ces neuroblastes ont pour caractéristique d'avoir une division asymétrique.

2) Contrôle de l'entrée et de la sortie de mitose

a) Entrée en mitose sous le contrôle du complexe Cycline B-CDK1

L'entrée en mitose est vérifiée par plusieurs points de contrôle. Elle est tout d'abord régie par le point de contrôle des dommages à l'ADN G2/M (cf partie Le point de contrôle des dommages à l'ADN), ainsi que du point de contrôle de l'antéphase (Pines and Rieder, 2001). De plus, elle est également sous le contrôle d'un complexe, Cycline B-Cdk1, qui pilote de nombreux mécanismes cellulaires conduisant à la mitose. Celui-ci subit de nombreuses régulations. Cycline B-Cdk1 a été mis en évidence comme étant l'ensemble catalytique constituant le complexe appelé MPF (*Mitosis Promoting Factor*). Chez le Xénope, l'injection de MPF dans des cellules en interphase d'œufs est suffisante pour déclencher l'entrée en mitose (Lohka et al., 1988).

Alors non identifiés, les acteurs du MPF y ont ensuite été caractérisés (Gautier et al., 1988, 1990). Dans ce complexe, la Cycline B a un rôle de régulateur de Cdk1 qui est une kinase et porte donc l'activité catalytique de phosphorylation des cibles.

La synthèse du complexe commence en phase S, avec un pic en G2, et elle est stimulée par plusieurs facteurs de transcription, dont *Forkhead box protein M1* (FoxM1, Fung and Poon, 2005; Laoukili et al., 2005). Au cours des phases S et G2 du cycle, la régulation de la cycline B a lieu par transcription/dégradation, et celle de l'activité de Cdk1 par des phosphorylations inhibitrices de sa T-loop par Wee1/Myt1 (O'Farrell, 2001). Ce système permet de restreindre un haut niveau protéique de ce complexe à la phase G2 du cycle et en début de mitose, chez les métazoaires. Il est admis qu'une concentration critique définie de Cycline B-Cdk1 est nécessaire pour l'activer, à la fois chez le Xénope (Fung and Poon, 2005; Murray et al., 1989) mais aussi chez les mammifères (Solomon et al., 1990), et ainsi contrecarrer l'action inhibitrice de Wee1 précédemment décrite.

Lors de la transition G2/M, un ensemble de protéines, constituant un réseau de régulations autour de Cycline B-Cdk1 se met en place, créant une série de rétrocontrôles positifs redondants (voir Figure 2), qui entraîne la transcription et la dégradation de nombre de ces acteurs de régulation (De Boer et al., 2008; Fung et al., 2007; Gong et al., 2007; Mitra and Enders, 2004, en cellules humaines). Cette phase permet d'atteindre la concentration critique nécessaire à l'activation de Cycline B-Cdk1. Il va être présenté ici une partie de ces régulations.

Cdk1 est la cible des phosphatases Cdc25 qu'il régule. Il les active, ce qui a pour effet d'inverser la phosphorylation inhibitrice de sa T-loop, et donc d'augmenter son activité et par conséquent celles des Cdc25 (O'Farrell, 2001).

Polo-like kinase 1 (Plk1), une kinase mitotique, va également jouer un rôle dans ces boucles de contrôle. Elle est considérée comme un facteur déterminant du timing d'entrée en mitose chez le xénope et en cellules humaines (Qian et al., 1998; Sumara et al., 2004) et agit à plusieurs niveaux. Tout d'abord, au niveau transcriptionnel *via* son action sur le facteur de transcription FoxM1 (Fu et al., 2008), Plk1 augmente sa propre quantité, ainsi que celles de Cdk1, de la Cycline B et de la

famille Cdc25 (Laoukili et al., 2005; Wang et al., 2005; Wierstra and Alves, 2007, en cellules de mammifères). Plk1, de concert avec Aurora A, une autre kinase, aide également à la maturation des centrosomes (Giet et al., 2002), ce qui y cible Cycline B-Cdk1. Le complexe va y être phosphorylé (Jackman et al., 2003) et augmente ainsi son activité, comme montré dans de nombreux organismes (Barr and Gergely, 2007), dont la drosophile (Berdnik and Knoblich, 2002; Sunkel and Glover, 1988). De plus, Plk1 phosphoryle la Cycline B (B1), ce qui la cible au noyau, où sont la plupart de ses cibles (Toyoshima-Morimoto et al., 2001).

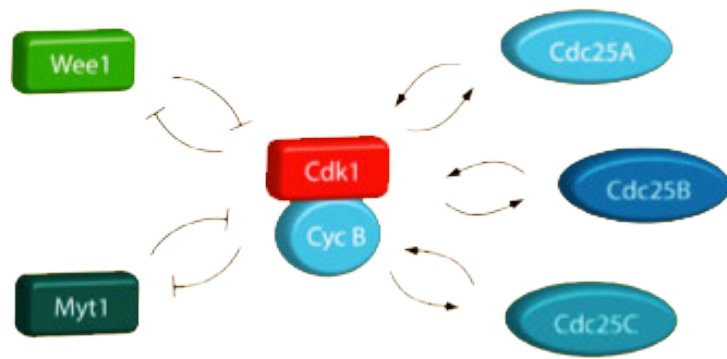
Plk1 inhibe Myt1 et Wee1, des inhibiteurs de Cdk1, et active Cdc25 (Lowery et al., 2007; Nakajima et al., 2003; Toyoshima-Morimoto et al., 2002, sur cellules humaines), rôle potentialisé par la phosphorylation initiatrice de Cycline B-Cdk1 (Elia et al., 2003a, 2003b; Watanabe et al., 2005, en cellules humaines). Ceci augmente en retour l'activation de Cycline B-Cdk1, qui phosphoryle Bora (entraînant sa dégradation via l'action de Plk1) et Aurora A (ce qui augmente son activité), et active ainsi Plk1 (Chan et al., 2008; Hutterer et al., 2006; Macûrek et al., 2008; Seki et al., 2008a, 2008b, sur cellules humaines ou chez la drosophile).

Aurora A est également capable de phosphoryler Cdc25B, ce qui stimulerait davantage l'activation de Cycline B-Cdk1 (Dutertre et al., 2004, sur cellules humaines).

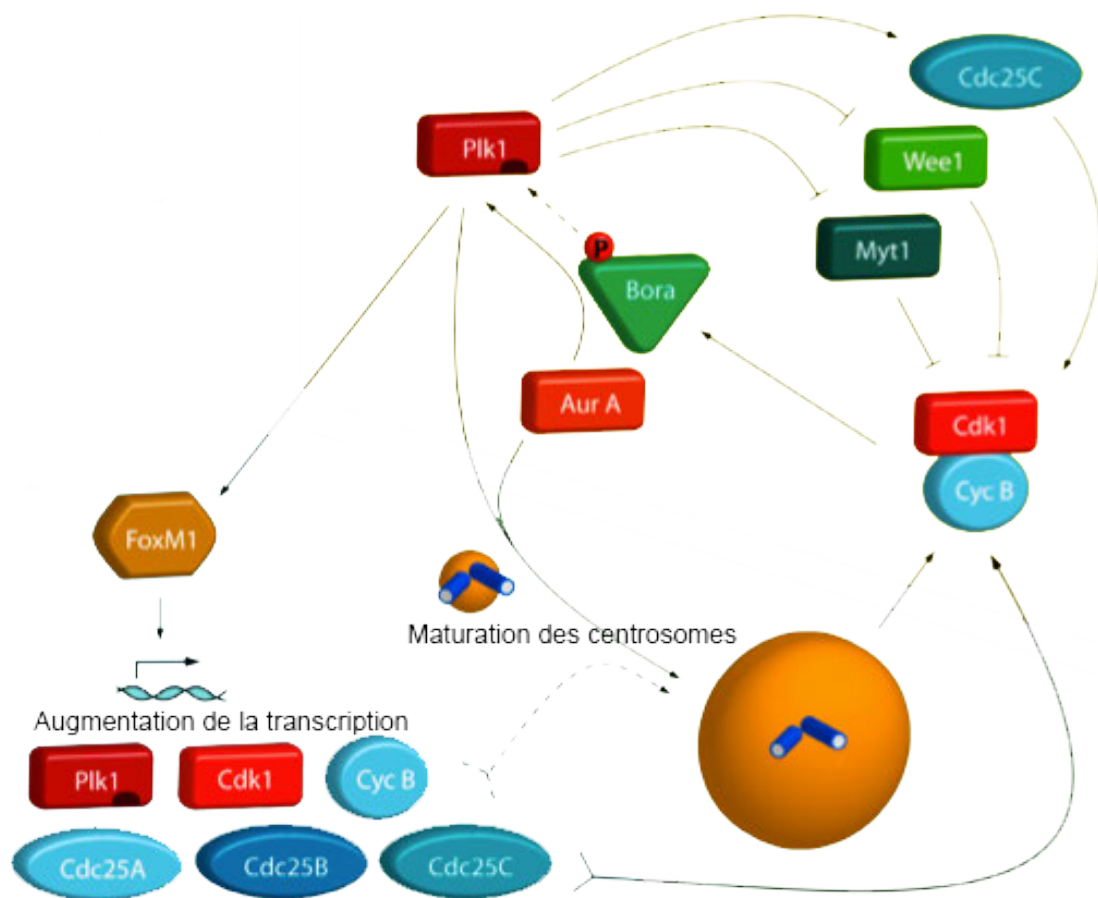
Ces voies de régulation du complexe Cycline B-Cdk1 ont été montrées comme étant très largement redondantes, leur altération n'a donc que peu d'effet sur l'entrée en mitose, une fois celles-ci activées, l'entrée en mitose sera inéluctable (Lindqvist et al., 2007; Mitrophanov and Groisman, 2008; Pomerening et al., 2003, 2008). Cette redondance peut être illustrée par le fait que, chez la drosophile, les centrosomes malgré leur participation, comme indiqué plus haut, à l'activation de Cycline B-Cdk1, ne sont pas nécessaires pour le cycle cellulaire et donc, *a fortiori*, pour l'entrée en mitose (Basto et al., 2006). Autre exemple, la localisation de Plk1 aux centrosomes n'est pas nécessaire, en cellules humaines, à l'entrée en mitose (Hanisch et al., 2006; Lénárt et al., 2007), tant qu'aucun arrêt du cycle n'est déclenché (Toczyski et al., 1997; Vugt et al., 2004, chez la levure et chez le xénope).

L'ensemble des voies de rétrocontrôle positif permet ainsi au complexe CyclineB-Cdk1 d'excéder la concentration critique. Cet événement autorise l'entrée en mitose, par accumulation de celui-ci dans le noyau, et par la phosphorylation de ses cibles.

Parmi celles-ci, Aurora A et Plk1 mettent en place le fuseau mitotique. En effet, Aurora A va, chez la drosophile et en cellules de mammifères, recruter notamment, par phosphorylation, la Centrosomine, D-TACC et la γ -tubuline, nécessaires au fonctionnement des centrosomes et à la constitution des microtubules (Giet et al., 2002; Terada et al., 2003). Les lamines, phosphorylées, se dissocient, entraînant la rupture de l'enveloppe nucléaire (Heald and McKeon, 1990; Peter et al., 1990, *in vitro* et en cellules de mammifère), marquant la prométaphase de mitose, juste au moment du maximum d'activité de CyclineB-Cdk1. Sous l'effet de la phosphorylation effectuée par CyclineB-Cdk1, le cytosquelette est également réorganisé (Chou et al., 1990, 2003, en cellules de mammifère), et les chromosomes condensés à la suite de la phosphorylation des condensines (Kimura et al., 1998, chez le xénope). L'enchaînement de ces faits entraîne le début de la mitose.



Régulations directes entre CycB-Cdk1 et ses cibles



Régulations indirectes entre CycB-Cdk1 et ses cibles

Figure 2 : Exemples de boucles de régulation entre Cycline B-Cdk1 et ses cibles. En haut on peut voir les principales régulations directes entre le complexe et ses cibles, et en bas les principales régulations indirectes (adapté d'après Lindqvist et al., 2009).

b) Sortie de mitose : le rôle de l'APC/C

L'APC/C (ou *Anaphase Promoting Complex/Cyclosome*) est une E3 ubiquitine ligase qui est surtout active pendant la mitose, où elle va permettre son bon déroulement, en entraînant la dégradation via le protéasome de substrats importants pour la sortie de mitose.

Elle est régulée principalement par deux sous-unités, Cdc20 (durant l'essentiel de la mitose) et Cdh1 (à partir de la fin de l'anaphase), qui définissent sa spécificité de substrat. D'autres existent, comme Cortex, en méiose, chez la drosophile. Cortex intervient par exemple dans la régulation la transition ovocyte/embryon, en dégradant Matrimony, un inhibiteur de Plk1 (Whitfield et al., 2013). Les sous-unités sont régulées par phosphorylation ou par ubiquitylation (Foe et al., 2011; Foster and Morgan, 2012; Hyun et al., 2013).

Enfin, des pseudosubstrats peuvent, seuls ou au sein de complexes, inhiber l'activité de l'APC/C, comme Emi1/Rca1 qui est actif avant la mitose et permet l'accumulation des cyclines et CDK nécessaires à cette dernière chez le xénope, en empêchant leur dégradation prématurée (Reimann et al., 2001) ou BubR1 (qui intervient, au sein du *Mitotic Checkpoint Complex* (MCC), dans le SAC (cf. partie Le point de contrôle de l'assemblage du fuseau mitotique).

Durant la mitose, une fois le SAC inactivé, l'APC/C-Cdc20 redevient actif et peut ubiquityler ses substrats. En effet, l'APC/C va alors ubiquityler la Sécurine et la Cycline B, les adressant alors au protéasome. De ce fait, la Sécurine est dégradée, ce qui libère la Séparase. Une fois libérée, la Séparase va cliver les anneaux de cohésines centromériques qui conservaient ensemble les chromatides sœurs (Gruber et al., 2003; Uhlmann et al., 1999, chez la levure et en cellules d'insecte) et permettaient l'établissement de la tension (cf. partie Attachement des kinétochores aux microtubules du fuseau mitotique). Ainsi, sous l'action des microtubules, la ségrégation des chromatides sœurs en deux groupes identiques vers chacun des pôles peut avoir lieu. Ces deux groupes formeront le patrimoine génétique de chacune des deux cellules filles.

La Cycline B va également être dégradée, ce qui va provoquer la dissociation de la Cycline B de Cdk1, et ainsi empêcher le complexe de continuer à phosphoryler ses cibles, qui seront alors progressivement déphosphorylées par PP1 et PP2A (Axton et al., 1990; Mayer-Jaekel et al., 1993), permettant la sortie de mitose. En fin de mitose Cdh1 remplace Cdc20 en tant que sous-unité régulatrice de l'APC/C ce qui va induire le changement de sa spécificité de cibles et entraîner la dégradation d'autres protéines, comme Cdc20 (Hyun et al., 2013), puis aider à la poursuite du cycle cellulaire.

3) Les kinétochores

a) **Description des kinétochores**

Les kinétochores sont des complexes d'environ une centaine de protéines qui s'assemblent sur les centromères des chromosomes (Brinkley and Stubblefield, 1966; Cheeseman, 2014). Les centromères sont une zone du chromosome qui est marquée avec une histone H3 particulière, Cenp-A (Allshire and Karpen, 2008) et chez certains organismes dont la drosophile, des séquences particulières sur l'ADN reconnues par cette histone.

Les kinétochores sont divisés en plusieurs ensembles de protéines. Le *Constitutive Centromere Associated Network* (ou CCAN), constitué notamment de Cenp-A et Cenp-C, forme l'*inner kinetochore* et persiste au cours du cycle cellulaire. Il sert de site d'assemblage des autres ensembles (revue dans Cheeseman and Desai, 2008; Verdaasdonk and Bloom, 2011). Sur cet *inner kinetochore* vient s'assembler le complexe KMN (constitué de KNL1, du complexe Ndc80 et du complexe Mis12), qui forme l'*outer kinetochore*, et la couronne (*corona*) qui est constituée de nombreuses protéines interagissant avec ce complexe.

b) Attachement des kinétochores aux microtubules du fuseau mitotique

L'attachement des kinétochores aux microtubules du fuseau mitotique est un processus hautement régulé. Il permet, en mitose, de partitionner correctement les chromosomes entre les deux cellules filles. Dans ce but, l'attachement des kinétochores aux microtubules doit être amphitélisque (McIntosh et al., 2002; Tanaka, 2002), ce qui est, entre autres, contrôlé par le SAC, qui sera abordé dans la partie suivante. Cet attachement est permis grâce à de nombreuses protéines présentes sur les microtubules et les kinétochores, comme CENP-E (Vitre et al., 2014) ou Ndc80/Hec1, et plus globalement le complexe KMN (Cheeseman and Desai, 2008; Cheeseman et al., 2006; Wei et al., 2007).

Le kinétochore interagit, dans un premier temps, avec la partie latérale du microtubule puis est déplacé vers son extrémité + (Rieder and Alexander, 1990; Tanaka et al., 2005). Cette action est permise notamment par le complexe RZZ (Rod, Zw10, Zwilch, montré chez la drosophile, Buffin et al., 2005; Karess, 2005; Williams et al., 2003). Ce complexe, absent chez la levure, est impliqué dans l'interaction avec la dynéine, permettant le déplacement des kinétochores le long des microtubules (Basto et al., 2004; Starr et al., 1998).

Quant aux chromatides sœurs, en mitose, elles sont attachées entre elles par des complexes appelés cohésines (Nasmyth, 2001, 2002), qui, à ce stade, ont été retirés des bras et ne sont plus situés qu'entre les centromères chez la drosophile. Ces cohésines vont permettre l'établissement d'une tension en s'opposant à la force exercée par les microtubules en métaphase, et faciliter leur bi-orientation (Dewar et al., 2004, chez la levure).

Cette tension est une des manifestations de l'attachement correct des kinétochores aux microtubules, et permet de les stabiliser (Nicklas, 1997; Nicklas and Koch, 1969, en cellules d'insecte). L'absence de tension sur les kinétochores est considérée, par la cellule, comme le marqueur d'un attachement incorrect. La cellule va alors corriger cet attachement par l'action du *Chromosomal Passenger Complex* (CPC, constitué d'INCENP, Borealin, Survivin et Aurora B) et notamment d'Aurora

B, cette dernière étant conservée de la levure aux mammifères (Biggins et al., 1999; Hauf et al., 2003; He et al., 2001; Lampson et al., 2004). Cette kinase entraîne la déstabilisation de l'attachement kinétochore/microtubules anormal en phosphorylant des protéines importantes pour celui-ci (Tanaka et al., 2002), comme la Kinésine 13 (MCAK) (Lan et al., 2004; Ohi et al., 2004), CENP-A (Kunitoku et al., 2003), DSN1 (Welburn et al., 2010), et Ndc80 (Cheeseman et al., 2006) chez les eucaryotes supérieurs, ou Dam1 et Spc34 chez la levure (Cheeseman et al., 2001; Janke et al., 2002; Jones et al., 2001; Li et al., 2002). Située entre les deux centromères sœurs au sein du complexe CPC (*Chromosomal Passenger Complex*) avec notamment INCENP, en absence de tension, elle va être en contact de ses substrats, alors que, lors de la mise en tension des kinétochores, il est supposé que ces derniers vont être éloignés de cette zone, empêchant Aurora B d'agir sur eux.

D'autres hypothèses expliquent également la détection de la tension par d'autres protéines, comme la Survivine et INCENP (Bir1 et Sli15 chez la levure), déjà connues comme régulant Aurora B (Ruchaud et al., 2007), et qui, de part leur position entre le kinétochore et les microtubules dans le CPC, pourraient avoir cette fonction (Sandall et al., 2006). PICH est également proposée, aux vues de son action sur les *Ultra Fine Bridges* (voir partie sur les dommages à l'ADN en mitose), qui implique une localisation entre les centromères des chromatides sœurs (Baumann et al., 2007), et donc serait idéale à cette fonction.

Une autre protéine, Sugoshin 1 (Sgo1), a également été montrée comme senseur de la tension (Indjeian et al., 2005). De plus, elle forme un complexe avec une autre protéine, PP2A (Kitajima et al., 2006), une phosphatase, qui est requise pour la ségrégation correcte des chromosomes (Tang et al., 2006). Son rôle est similaire à celui d'une autre phosphatase, PP1 : se localiser aux kinétochores et empêcher la phosphorylation des cibles d'Aurora B impliquées dans la déstabilisation de l'attachement kinétochore-microtubules (Pinsky et al., 2006a; Trinkle-Mulcahy et al., 2003).

Le modèle serait le suivant : Aurora B déstabilise les attachements kinétochore-microtubules. Lorsqu'un attachement est correct, de la tension va être exercée sur les kinétochores, ce qui va éloigner Aurora B de ses cibles dont la

phosphorylation déstabilise l'attachement. Plk1, qui est impliquée dans la génération de tension aux kinétochores (Sumara et al., 2004), va phosphoryler BubR1 (Matsumura et al., 2007), ce qui va avoir pour effet de recruter PP2A (Kruse et al., 2013; Suijkerbuijk et al., 2012a), et de stabiliser ces attachements (Lampson and Kapoor, 2005), en entraînant la déphosphorylation des cibles d'Aurora B.

4) Le point de contrôle de l'assemblage du fuseau mitotique

a) Définition du point de contrôle

En mitose, le point de contrôle de l'assemblage du fuseau mitotique, ou *Spindle Assembly Checkpoint* (SAC) a pour rôle de contrôler l'attachement bi-orienté (amphitélétique) des kinétochores des chromosomes aux microtubules. L'objectif est ainsi d'éviter une mauvaise ségrégation des chromatides sœurs due à un défaut d'attachement aux microtubules : soit par une absence d'attachement, soit par des attachements incorrects de type monotéliques, mérotéliques ou syntéliques (voir Figure 3). Les différents attachements mérotéliques, divisés en plusieurs sous-catégories en fonction de la proportion de fibres K (fibres kinétochoriennes) en provenance de chaque pôle, ne sont pas tous détectés (Gegan et al., 2011; Sluder et al., 1997)

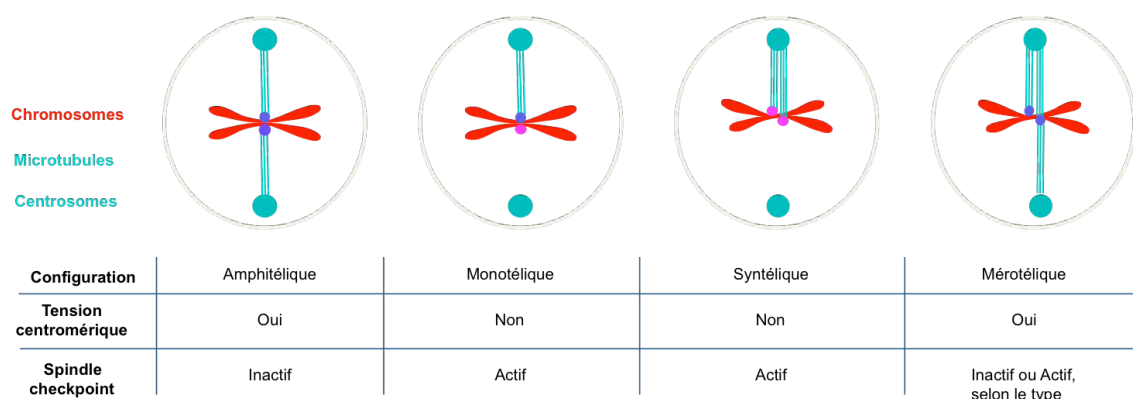


Figure 3 : Les différentes configurations d'attachement possibles des kinétochores aux microtubules, et leur effet sur la tension et le SAC.

De cette manière, chaque chromatide sera attachée à un seul des centrosomes des deux pôles via les extrémités + des microtubules, et chaque chromosome de manière bipolaire, pour que chaque chromatide homologue puisse être tractée dans une des deux cellules filles (Hardwick et al., 1999; Rieder et al., 1994). Conservé chez tous les eucaryotes (Elledge, 1996), le SAC prévient ainsi l'aneuploïdie en induisant un délai d'entrée en anaphase qui s'ajoute au timing de base de la mitose (Meraldi et al., 2004), pour permettre l'attachement correct des chromosomes au fuseau mitotique. Sa dysfonction est connue comme ayant un rôle dans la tumorigénèse (Li et al., 2009).

Le SAC a une régulation très sensible : en effet un seul kinétochore non correctement attaché suffit à activer le SAC et empêcher la poursuite de la mitose (Li and Nicklas, 1995; Nicklas et al., 1995; Rieder et al., 1995). Il a pourtant, au delà de la détection du premier kinétochore non attaché, une régulation graduelle en fonction du nombre de chromosomes présentant des défauts d'attachement (Collin et al., 2013; Dick and Gerlich, 2013). Ce mauvais attachement des microtubules sur les kinétochores va être déstabilisé par Aurora B, ce qui va créer un kinétochore détaché, reconnu par le SAC (Pinsky and Biggins, 2005; Pinsky et al., 2006b).

Le SAC est nécessaire pour permettre une ségrégation correcte des chromosomes en présence d'une anomalie d'attachement kinétochores/microtubules. Il est essentiel chez de nombreux métazoaires, à l'exception notable de la drosophile (Buffin et al., 2007), où, en l'absence de défauts d'attachement des kinétochores aux microtubules, son inactivation ne nuit pas à la viabilité de l'individu.

Les protéines intervenant dans le SAC ont d'abord été mises en évidence chez la levure par crible génétique, et ont été nommées par leurs phénotypes comme *Mitotic Arrest Deficient* (pour les protéines MAD 1, 2 et 3, cette dernière étant aussi appelée BubR1) ou *Budding Uninhibited by Benzimidazole* pour les protéines BUB, Bub1 et Bub3 (Hoyt et al., 1991; Li and Murray, 1991). Puis, plus tard, Mps1 a été identifiée (Weiss and Winey, 1996). Elles se fixent sur les kinétochores non ou mal attachés par les microtubules.

Mad2 et BubR1 accomplissent leur action en entrant en compétition avec les partenaires de Cdc20 (Fzy chez la drosophile), qui est la sous-unité régulatrice pendant la mitose d'une E3 ubiquitine ligase appelée APC/C. Ainsi, elles altèrent l'interaction APC/C-Cdc20 (Dawson et al., 1995; Sudakin et al., 2001; Visintin et al., 1997). Cela a pour conséquence d'empêcher la dégradation par le protéasome 26S des cibles de ce complexe, ce qui va bloquer la survenue de l'anaphase et donc la sortie de mitose. L'enchaînement de ces événements permettra de conserver les chromatides sœurs des chromosomes ensemble jusqu'à leur alignement sur le fuseau mitotique (Cohen-Fix et al., 1996; Murray et al., 1989; Shirayama et al., 1999).

L'APC/C-Cdc20 va dégrader en particulier la Cycline B, ce qui déclenche la poursuite du cycle cellulaire en inhibant l'activité de Cdk1. Il va aussi dégrader la Sécurine, ce qui conduit à la libération de la Séparase (Cut2 chez la levure), qui elle, peut cliver les cohésines et libérer les chromatides sœurs des chromosomes, permettant ainsi leur ségrégation indépendamment l'une de l'autre vers les pôles de la cellule, lors de l'anaphase (Funabiki et al., 1996; Nasmyth and Haering, 2009; Pines, 2011).

Pour entrer davantage dans le détail de cette régulation, il faut savoir que la spécificité de cibles de l'APC/C est portée par Cdc20, qui reconnaît sur les protéines cibles des motifs de dégradation (ou dégrons) spécifiques. Ce sont les boîtes KEN et D-box (Glutzer et al., 1991; Pflieger and Kirschner, 2000; Pflieger et al., 2001; Tian et al., 2012; Zur and Brandeis, 2001). On reviendra sur ces motifs au cours de la description du mécanisme du SAC.

b) Mise en place du point de contrôle

Au début de la mitose, en prométaphase, lors de la formation des kinétochores, Bub1, y est recrutée par KNL1 (aussi appelée Blinkin ou Spc105) et le complexe RZZ (Karess, 2005). Ce complexe, absent chez la levure, va faciliter la localisation des protéines du SAC au kinétochore, et faciliter leur retrait de ce dernier une fois le checkpoint accompli. Cette action de recrutement par KNL1 dépend de leur phosphorylation par Mps1 (London et al., 2012; Maciejowski et al., 2010; Santaguida

et al., 2010; Shepperd et al., 2012; Slidrecht et al., 2010; Yamagishi et al., 2012). Elle permet à Mad1 de se localiser au kinétochore en interagissant avec Bub1, protéine stable au kinétochore (Howell et al., 2004; London and Biggins, 2014; Shah et al., 2004; Sharp-Baker and Chen, 2001). Mad1 va recruter à son tour O-Mad2, qu'elle va convertir en C-Mad2 (Johnson et al., 2004; Kops et al., 2005; Luo et al., 2002; Martin-Lluesma et al., 2002; McClelland et al., 2003).

Mad2 existe sous deux formes. Une première forme ouverte, O-Mad2, qui est la forme la plus répandue dans la cellule (De Antoni et al., 2005; Vink et al., 2006) et peut se dimériser avec C-Mad2. Une deuxième forme, C-Mad2 justement, qui peut se lier à Mad1 ou Cdc20 (Luo et al., 2000, 2002, 2004; Sironi et al., 2002). La dimérisation transitoire de C-Mad2 avec O-Mad2 entraîne la conversion de ce dernier en C-Mad2 (Mapelli et al., 2007). Cette conversion lui permet de former un complexe C-Mad2-Cdc20, qui va servir de base à un complexe appelé *Mitotic Checkpoint Complex*, ou MCC, et être l'effecteur du SAC (De Antoni et al., 2005; Mapelli and Musacchio, 2007). Cette réaction de conversion peut être bloquée par p31^{comet} (voir la partie inactivation du point de contrôle). Lors de la mise en place du point de contrôle, celui-ci subirait une phosphorylation inhibitrice de Mps1 l'empêchant d'aller à l'encontre de ce mécanisme (Hewitt et al., 2010; Tighe et al., 2008; Westhorpe et al., 2011).

Bub1 va également recruter Bub3, qui va recruter en suivant BubR1 (Johnson et al., 2004; Rischitor et al., 2007; Sharp-Baker and Chen, 2001; Taylor et al., 1998; Vanoosthuyse et al., 2004). L'amplitude de la génération des complexes Mad1-C-Mad2 et C-Mad2-Cdc20 (et en particulier celle du recrutement de Mad2 aux kinétochores) va dépendre du nombre de chromosomes non correctement attachés. Le nombre de complexes générés va ainsi réguler l'intensité d'activation du SAC, qui n'a pas un fonctionnement de type interrupteur, mais davantage semblable à un variateur. A l'inverse, le complexe Bub1-Bub3-BubR1 ne semble pas subir ce type de régulation (Chen, 2002; Collin et al., 2013; Dick and Gerlich, 2013; Hardwick et al., 2000; Kulukian et al., 2009; Westhorpe et al., 2011).

Le complexe C-Mad2-Cdc20 va ensuite interagir avec le complexe BubR1-Bub3, via la fixation Mad2 dépendante de BubR1, qui est acétylé (Choi et al., 2009),

sur le site DYY de Cdc20 par son domaine KEN, formant le MCC. Cette caractéristique fait de BubR1 un pseudo-substrat de l'APC/C (Burton and Solomon, 2007; Davenport et al., 2006; Hardwick et al., 2000; King et al., 2007a; Musacchio and Salmon, 2007; Rahmani et al., 2009; Sczaniecka et al., 2008; Sudakin et al., 2001). Ce mécanisme est représenté de manière simplifiée sur la Figure 4.

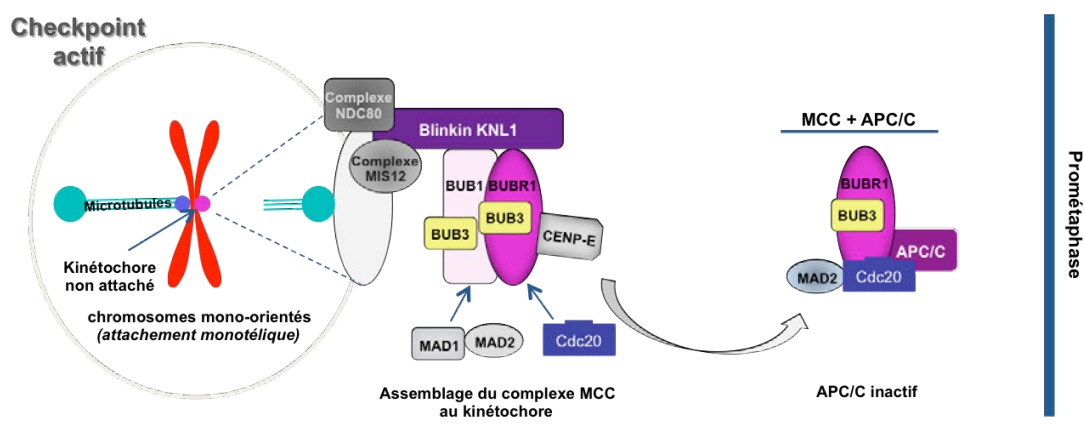


Figure 4 : Schéma simplifié de la mise en place du SAC, indiquant les événements principaux

Cette formation du MCC peut être facilitée par des phosphorylations sur BubR1 (de Mps1, via l'action de Plk1, chez la drosophile, et Aurora B (Ipl1p), chez la levure), Mad2 (de Mps1 (Mph1), chez *S. pombe*) ou Cdc20 (de Bub1, en cellules humaines) (Conde et al., 2013; King et al., 2007b; Tang et al., 2004; Zich et al., 2012).

Le MCC va ensuite se fixer sur l'APC/C et l'inhiber, via l'action synergique de BubR1 et Mad2 sur Cdc20 (Fang, 2002; Tang et al., 2001). Cette synergie serait liée au fait que la KEN box de BubR1 interagit parallèlement avec C-Mad2 et Cdc20 (Chao et al., 2012).

Plus précisément, la fixation de Cdc20 intégrée au MCC sur l'APC/C se fait différemment de quand il est lié avec un substrat, Mad2 interagissant avec le motif MIM (*Mad2 Interacting Motif*) de Cdc20 qui est impliqué également dans son interaction avec l'APC/C. Cette interaction avec l'APC/C a lieu au sein d'un motif englobant le motif MIM appelé, d'après sa séquence, KILR (Hwang et al., 1998; Izawa and Pines, 2012; Luo et al., 2002; Sironi et al., 2002; Zhang and Lees, 2001).

Ceci perturberait le fonctionnement correct du complexe APC/C-Cdc20 et empêcherait Cdc20 de former un récepteur à la D-box, de la même manière qu'observé avec Cdh1, l'autre sous-unité régulatrice de l'APC/C (Buschhorn et al., 2011; Chao et al., 2012; da Fonseca et al., 2011; Herzog et al., 2009). Combiné au fait que BubR1 bloque également le site de fixation aux substrats comprenant une KEN box (comme la Sécurine), ceci confère au MCC un fort pouvoir inhibiteur de l'APC/C (Izawa and Pines, 2012).

Un autre système de régulation vient se superposer à ceux décrits précédemment. Cdc20 continue d'être synthétisée en mitose, et le complexe MCC la transforme en cible de l'ubiquitylation de l'APC/C, ce qui entraîne sa dégradation par le protéasome (chez la levure et en cellules humaines, Foe et al., 2011; Foster and Morgan, 2012; Ge et al., 2009; Pan and Chen, 2004). Ceci ajoute de la dynamique à ce système, en permettant l'établissement du SAC par la limitation du niveau cellulaire de Cdc20, et une levée plus rapide de l'inhibition lorsque le SAC est inactivé, par un renouvellement/réassemblage constant du MCC tant que le SAC est actif (King et al., 2007a; Mansfeld et al., 2011; Musacchio and Ciliberto, 2012; Nilsson et al., 2008).

Il a enfin été montré qu'un arrêt prolongé en mitose lié au SAC va nécessiter d'autres acteurs afin d'empêcher une dégradation progressive des substrats de l'APC/C, comme CenpE (Cenp-meta chez la drosophile) (Rubin et al., 2014).

c) Inactivation du point de contrôle

Une fois tous les chromosomes correctement attachés au fuseau mitotique, le point de contrôle va être inactivé. Cette situation, habituelle, est à distinguer d'un autre cas, appelé adaptation au SAC. Cette dernière entraîne la poursuite de la mitose, même si les chromosomes ne sont pas correctement attachés. Cette situation advient sans inactivation du checkpoint, qui a lieu la plupart du temps suite à la mutation d'une des protéines du SAC, comme Bub1 ou Mad2 (Dobles et al., 2000; Michel et al., 2001; Taylor and McKeon, 1997) ou à un arrêt prolongé en mitose, et conduit presque exclusivement à l'apoptose de la cellule.

L'inactivation du SAC est très rapide, de manière à empêcher la fatigue de cohésion (*Cohesion Fatigue*) qui entraîne la séparation spontanée, non synchronisée, des chromatides sœurs, et un attachement incorrect du fuseau aux kinétochores (Daum et al., 2011; Stevens et al., 2011), causant de l'aneuploïdie. Ce phénomène est lié, selon un des modèles proposés, à une ouverture spontanée, dite « respiration », des cohésines, qui va permettre cette séparation. Un autre modèle explique quant à lui cette ouverture par une modification post-traductionnelle sur une des cohésines. L'inactivation du SAC est issue de la combinaison de nombreux mécanismes.

Tout d'abord, on sait que lorsque les kinétochores sont tous attachés au fuseau, ils subissent un « stretch » au fur et à mesure de leur attachement aux microtubules. Les protéines Mad1 et Mad2 en sont alors retirées. Cela provoque la disparition du complexe Mad1-C-Mad2 des kinétochores, et empêche la génération du complexe C-Mad2-Cdc20, précurseur du MCC (Maresca and Salmon, 2009; Musacchio and Salmon, 2007; Uchida et al., 2009). A eux seuls ces phénomènes sont d'importance, puisqu'il a été montré qu'il suffisait de maintenir ces protéines aux kinétochores ou de supprimer le « stretch » pour maintenir le SAC (Maldonado and Kapoor, 2011; Uchida et al., 2009). Le retrait de Mad1-C-Mad2 a lieu *via* l'action de la dynéine cytoplasmique (recrutée par l'action de Spindly) qui déplace les protéines Mad1, Mad2, le complexe RZZ et Spindly (qui permet également l'attachement kinétochores/microtubules), vers les pôles de la cellule, en suivant les microtubules (Basto et al., 2004; Gassmann et al., 2010; Griffis et al., 2007; Howell et al., 2001; Karess, 2005; Wojcik et al., 2001).

Un autre mécanisme est également à l'œuvre, *via* la déphosphorylation de KNL1 par PP1. Il abolit l'interaction de KNL1 avec RZZ et Bub1, empêchant le maintien au kinétochore de Bub3-BubR1, mais également de Mad1-C-Mad2 (Espeut et al., 2012; Meadows et al., 2011; Pinsky et al., 2009; Rosenberg et al., 2011; Vanoosthuyse and Hardwick, 2009). Cette déphosphorylation de KNL1 est également réalisée par PP2A-B56 lorsqu'elle interagit avec BubR1 au kinétochore. Dans cette situation, PP2A-B56 va retirer spécifiquement les phosphorylations réalisées par Mps1, ce qui va amplifier la perte de localisation de Bub1 et du complexe Bub3-BubR1 au kinétochore (Espert et al., 2014).

La délocalisation de ces deux complexes a pour conséquence l'arrêt de la formation du MCC. Les complexes MCC déjà formés vont quant à eux continuer d'être dégradés via l'ubiquitylation de Cdc20 qui avait déjà lieu lors du fonctionnement du SAC, que nous avons décrite précédemment (Foster and Morgan, 2012; Mansfeld et al., 2011; Uzunova et al., 2012; Varetti et al., 2011). Le remplacement des complexes MCC liés à l'APC/C par Cdc20 seul ou lié à ses substrats va survenir. BubR1 va également être déacétylé et donc se transformer en substrat de l'APC/C (via son motif KEN), comme observé dans les cellules humaines et potentiellement chez la levure (Choi et al., 2009; King et al., 2007a).

Ces dernières actions sont potentialisées par le rôle de p31^{comet}, qui se fixe sur Mad2, entraînant une augmentation de la vitesse de dégradation de Cdc20 au sein du MCC, ainsi qu'une dissociation de ce dernier, mais qui bloque aussi la dimérisation C-Mad2-O-Mad2 (Mapelli et al., 2006; Teichner et al., 2011; Varetti et al., 2011; Vink et al., 2006; Westhorpe et al., 2011; Xia et al., 2004; Yang et al., 2007).

Enfin, des phosphatases inversent le rôle des kinases mitotiques qui avaient aidé l'activation du SAC (Lesage et al., 2011). Ce mécanisme est représenté sous une forme simplifiée en Figure 5.

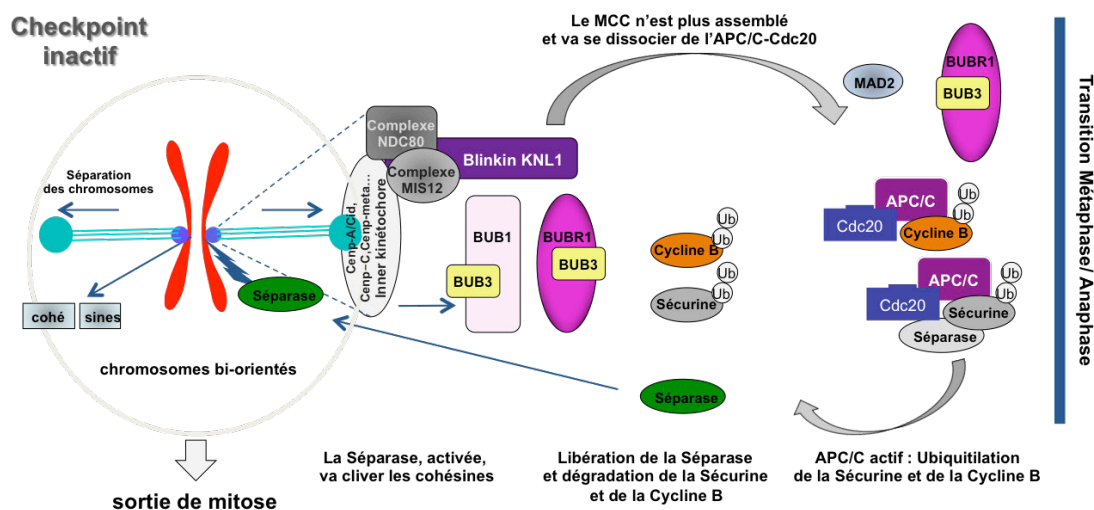


Figure 5 : Schéma simplifié des événements principaux marquant l'inactivation du SAC et la sortie de mitose.

Cet ensemble de phénomènes permet la dégradation des substrats de l'APC/C-Cdc20 après la levée du SAC et donc l'entrée en anaphase, puis la sortie de mitose. En cas de détachement d'un chromosome alors que le SAC a été inactivé, ce dernier peut être réactivé jusqu'à la survenue de l'anaphase, au delà, l'inactivation est irréversible (Gerlich et al., 2006; Mirchenko and Uhlmann, 2010; Rattani et al., 2014; Shindo et al., 2012; Vázquez-Novelle and Petronczki, 2010).

5) La fonction et la régulation de BubR1 en mitose

BubR1, également appelé Mad3p (chez la levure, *C. elegans* ou les plantes) ou Bub1B (chez l'Homme), est une protéine d'environ 165kDa chez la drosophile, retrouvée chez la plupart des eucaryotes, avec des fonctions conservées, malgré des différences de structure de la partie C-terminale (Caillaud et al., 2009).

a) Les fonctions de BubR1 en mitose

Comme nous l'avons vu dans la partie précédente, BubR1 est un élément clé du SAC. En réalité, celui-ci ne représente qu'une seule de ses nombreuses activités dans la cellule, en lien avec les nombreuses protéines avec lesquelles elle interagit.

Au cours de la mitose, en prophase, BubR1 se localise principalement sur les kinétochores et y persiste jusqu'en métaphase, de manière Bub3 dépendante, ce qui est nécessaire à son activité (Jablonski et al., 1998; Taylor et al., 1998; Wang et al., 2001). Il en disparaît ensuite au cours de la survenue de l'anaphase, moment où elle est vraisemblablement dégradée (Visconti et al., 2010; Yang et al., 2011 en cellules humaines).

Chez quelques organismes, dont la levure, cette protéine a une structure différente de celle retrouvée habituellement dans la plupart des autres organismes eucaryotes. Elle diffère par l'absence de domaine kinase (qui est également retrouvée chez *C. elegans*), ce qui a laissé penser que celui-ci pouvait ne pas avoir de rôle, et être un domaine pseudo-kinase. Ce domaine kinase a été montré, notamment chez la

drosophile et dans les cellules humaines, comme nécessaire à l'attachement correct des kinétochores aux microtubules, probablement en s'opposant à l'activité d'Aurora B aux kinétochores (Ditchfield et al., 2003; Harris et al., 2005; Huang et al., 2008; Lampson and Kapoor, 2005; Rahmani et al., 2009). Cependant il a été supposé, chez les mammifères, que cette opposition passait par des phosphorylations sur ce domaine kinase, mais pas par une réelle activité kinase. Cette hypothèse a été étayée par l'observation que ce domaine n'est pas nécessaire lors d'une mitose normale, et que les résidus habituellement présents dans le consensus définissant un domaine kinase (comme ceux liés à l'hydrolyse de l'ATP) sont absents chez les mammifères (Suijkerbuijk et al., 2012b).

Un autre argument présenté est que dans les cellules humaines, la mutation utilisée jusque ici pour tenter d'établir un rôle de l'activité kinase de BubR1 en inactivant celle-ci déstabilise la protéine toute entière (Suijkerbuijk et al., 2012b). Il a aussi été montré par certaines équipes que les mutants où le domaine kinase a été inactivé (KD) dans les cellules humaines ou murines n'avaient pas d'impact sur l'attachement aux kinétochores (Elowe et al., 2007; Malureanu et al., 2009). Ceci est cependant soumis à controverse.

Chez la drosophile, dans un mutant BubR1 nul, l'activité kinase de BubR1 en elle-même a été démontrée *in vivo* comme ayant également un rôle dans cet attachement ainsi que dans l'arrêt prolongé en mitose lié à l'activation du SAC. Pour cela, un mutant *Kinase Dead* (où la fonction kinase a été inactivée) sous le contrôle d'un promoteur endogène a été utilisé. Dans ce mutant, les autres activités de BubR1 ne dépendant pas de l'activité kinase ont été vérifiées et montrées fonctionnelles (Rahmani et al., 2009).

Dans les cellules humaines, l'activité kinase de BubR1 a aussi été montrée comme responsable d'une autophosphorylation, et pouvant réguler l'attachement des kinétochores (Matsumura et al., 2007). Cette régulation pourrait passer par la phosphorylation d'une autre protéine, EB1, qui régule les microtubules (Zhang et al., 2007). Les observations infirmant l'activité kinase pourraient être liées au fait que les méthodes d'inactivation du BubR1 endogène utilisées dans les modèles souris et

humain, par ARN interférence, ne permettent pas d'éliminer complètement celui-ci. Ceci est d'ailleurs une des limites de cette technique.

En N-terminal du domaine kinase se situe un domaine appelé KARD, pour *Kinetochores Attachment Regulatory Domain*, qui comprend les positions S670, S676 et T680. Il est impliqué dans la stabilisation des interactions kinétochores/microtubules et la congression des chromosomes, par le recrutement de PP2A-B56 α , qui va contrecarrer l'action d'Aurora B en déphosphorylant ses substrats (Kruse et al., 2013; Suijkerbuijk et al., 2012a; Xu et al., 2013).

En continuant vers l'extrémité N-terminale, on trouve le *Bub3-Binding Domain*, qui, comme son nom l'indique, permet la liaison de BubR1 à Bub3, ainsi que sa localisation au kinétochoire (Taylor et al., 1998; Wang et al., 2001) et a été mis en évidence par étude de l'interaction de Bub3 avec des mutants de délétion de BubR1 chez la souris. L'interaction BubR1-Bub3 a été montrée comme étant nécessaire à ses activités SAC et de contrôle de l'attachement correct des kinétochores aux microtubules (Chen, 2002; Hardwick et al., 2000; Harris et al., 2005; Larsen et al., 2007).

Enfin en poursuivant vers le N-terminal de BubR1, on observe un dernier domaine qui permet la liaison à Cdc20, et va porter l'essentiel de l'activité SAC de BubR1. Cette activité est portée par deux motifs KEN (Davenport et al., 2006; Lara-Gonzalez et al., 2011; Rahmani et al., 2009; Sczaniecka et al., 2008), qui vont permettre à BubR1 d'inhiber Cdc20 au sein du complexe MCC en servant de pseudo-substrat.

Ces deux motifs KEN sont séparés par une série de répétitions TPR (*TricoPeptide Repeat*), qui permettent des interactions protéine/protéine avec KNL1/Spc105 (aide à la localisation de BubR1 au kinétochoire) et Cdc20 (requis pour l'assemblage du MCC) (Chao et al., 2012; Kiyomitsu et al., 2007; Lara-Gonzalez et al., 2011). Cet enchaînement de domaines est schématisé dans la Figure 6 ci-dessous.

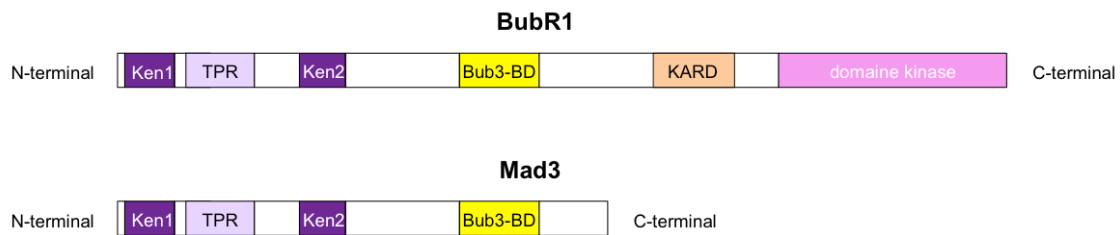


Figure 6 : Vue schématique des domaines constituant BubR1 chez les eucaryotes supérieurs (en haut) et de Mad3, son homologue chez les eucaryotes inférieurs, *C. elegans* et les végétaux (en bas).

BubR1 a également été impliquée dans d'autres mécanismes cellulaires, bien que les domaines y intervenant n'aient pas toujours été identifiés. Ainsi, BubR1, via son domaine kinase, a été montrée comme régulant l'activité et permettant la localisation de CenpE (Chan et al., 1998; Mao et al., 2003). Cette protéine, qui se localise aux kinétochores, est requise pour une capture et une stabilisation efficaces des microtubules par les kinétochores dans les cellules humaines (Chan et al., 1999; Weaver et al., 2003). Ceci lui permettrait de mesurer l'attachement des microtubules aux kinétochores.

BubR1 interagit également *in vitro* et en cellules humaines avec Ajuba, qui régule les microtubules et permettrait ainsi une ségrégation correcte des chromosomes (Ferrand et al., 2009), PARP-1 qui intervient dans la réponse aux dommages de l'ADN, dans des cellules murines (Fang et al., 2006), ainsi que P53 (*in vitro* et en cellules humaines) (Ha et al., 2007) et Tap73 (en cellules murines et humaines) (Tomasini et al., 2009), ce qui permet de réguler l'apoptose de cellules dont le fuseau mitotique est endommagé.

De plus, BubR1 aurait un rôle dans le vieillissement cellulaire et la longévité chez la souris, fonction qui dépendrait de SIRT2. Cela expliquerait les symptômes observés de vieillissement prématuré chez les patients atteints de *Mosaic Variegated Aneuploidy* qui présentent des mutations de BubR1 (Baker et al., 2004; North et al., 2014; Wijshake et al., 2012).

Enfin, BubR1 intervient dans la réponse aux cassures d'ADN double brin extensives lors de la mitose en retardant la transition métaphase/anaphase (Royou et

al., 2005). Ce point sera d'ailleurs développé au cours de cette introduction. Il intervient aussi dans cette réponse en participant à la ségrégation des fragments de chromosomes, en maintenant la stabilité d'une structure d'ADN couverte de protéines, le tether, qui relie les parties centrique (possédant un centromère) et acentrique d'un même chromosome, leur permettant de ségréger ensemble au cours de la mitose (Royou et al., 2010).

b) Les régulations de BubR1 en mitose

BubR1 est régulé en mitose par un ensemble de modifications post-traductionnelles comme des phosphorylations, des acétylations et des sumoylations, ainsi que par des interactions avec d'autres protéines.

Pour commencer, la stabilité de BubR1 en mitose, affectant l'ensemble de ses activités, est régulée par une balance acétylation/sumoylation, qui a été montrée sur cellules humaines et murines. En effet, BubR1 est acétylée en prométaphase sur la lysine K250 (position dans BubR1 humain) par la protéine PCAF aux kinétochores (Choi et al., 2009) qui est recrutée par BRCA2 (Choi et al., 2012). La déacétylation serait potentiellement effectuée par HDAC1-3, qui a été montrée comme interagissant avec BubR1, avant la survenue de l'anaphase. Cette acétylation n'a pas d'effet sur la liaison de BubR1 avec ses partenaires, ni sur son état de phosphorylation. Cependant, elle opère un changement qui va altérer sa stabilité. Ainsi, BubR1 est acétylée lorsqu'elle a un rôle d'inhibiteur de l'APC/C-Cdc20, au sein du complexe MCC, et cette acétylation est nécessaire cette fonction dans le SAC (Park et al., 2013) ; de plus, la déacétylation de BubR1 participe à l'inactivation du SAC. En effet, lorsqu'elle est déacétylée et sumoylée sur cet acide aminé K250, BubR1 va devenir le substrat de l'APC/C-Cdc20 puis celui de l'APC/C-Cdh1 en fin de mitose, et ainsi subir une dégradation ubiquitylation-dépendante par le protéasome (Choi et al., 2009; Yang et al., 2012). Ce mécanisme de régulation est similaire à celui qui a été démontré pour la dégradation de Emi1, inhibiteur puis substrat de l'APC/C-Cdh1 en interphase (Miller et al., 2006).

Le rôle de BubR1 dans le SAC est également régulé en cellules humaines par HBx qui atténue l'interaction BubR1-Cdc20 et régule via BubR1 la vitesse de ségrégation des chromosomes (Kim et al., 2008).

De plus, BubR1 est cible de nombreuses phosphorylations, qui lui permettent d'intégrer des informations sur différents événements cellulaires, et régulent son activité. Celles-ci ont été montrées en cellules humaines ou *in vitro* sur BubR1 humain, et n'ont pas toutes de fonction établie à l'heure actuelle. A cette occasion, il a été montré que Cdk1 phosphoryle les sérine 620, 670 et 1043 de BubR1 (Elowe et al., 2007, 2010). Mps1 phosphoryle également les sérines 620 et 1043 (Huang et al., 2008). Cependant seule la phosphorylation en S670 est sensible à l'attachement des microtubules sur les kinétochores, en étant phosphorylée en absence d'attachement, et régule le SAC (Elowe et al., 2010; Suijkerbuijk et al., 2012a). Le rôle de la phosphorylation en S1043 n'a pas encore été élucidé (Huang et al., 2008). Celle en S620 va, quant à elle, permettre le recrutement, à l'état phosphorylé, de Plk1, qui va ensuite pouvoir phosphoryler BubR1 pour réguler l'attachement. La mutation de cette position entraîne des défauts de la liaison kinétochore/microtubules. En effet, Plk1, une fois recrutée par BubR1, peut la phosphoryler en quatre positions différentes, S676, T680, T792 et T1008 (Elowe et al., 2007; Matsumura et al., 2007). Tous ces acides aminés, mutés, ont généré des défauts d'attachement (Matsumura et al., 2007; Suijkerbuijk et al., 2012a), qui peuvent sauver le phénotype causé par la déplétion de Plk1 (S676, T680, T792 et T1008).

En plus des positions déjà décrites ci-dessus, Mps1 phosphoryle également d'autres sérines dans BubR1 : la S435, qui est impliquée dans l'attachement (Huang et al., 2008), et la S543 (Huang et al., 2008), également phosphorylée par Cdk1 (Elowe et al., 2010), qui n'a pas encore été reliée à une fonction définie.

Enfin, BubR1 est capable de s'autophosphoryler de manière Cenp-E dépendante en T608 (Guo et al., 2012). Cela facilite l'alignement des chromosomes et améliore l'efficacité du SAC. Deux autres sites sont phosphorylés par une enzyme non encore déterminée, S574 et S720 (Elowe et al., 2010), S720 étant aussi impliqué, comme plusieurs autres sites déjà décrits, dans l'attachement des kinétochores aux microtubules.

Il est à noter que parmi les sites ici décrits, S670, T676 et T680 sont situés dans le KARD, et régulent le recrutement de PP2A-B56 α . A l'état phosphorylé ils vont permettre son recrutement, qui va être aboli quand ces sites seront à l'état déphosphorylé (Kruse et al., 2013; Suijkerbuijk et al., 2012a; Xu et al., 2013), stabilisant ou déstabilisant ainsi, respectivement, les attachements des microtubules sur les kinétochores, vraisemblablement en déphosphorylant les cibles d'Aurora B. Les principales fonctions et régulations de BubR1 chez l'Homme et la drosophile sont reprises dans la Figure 7 ci-dessous.

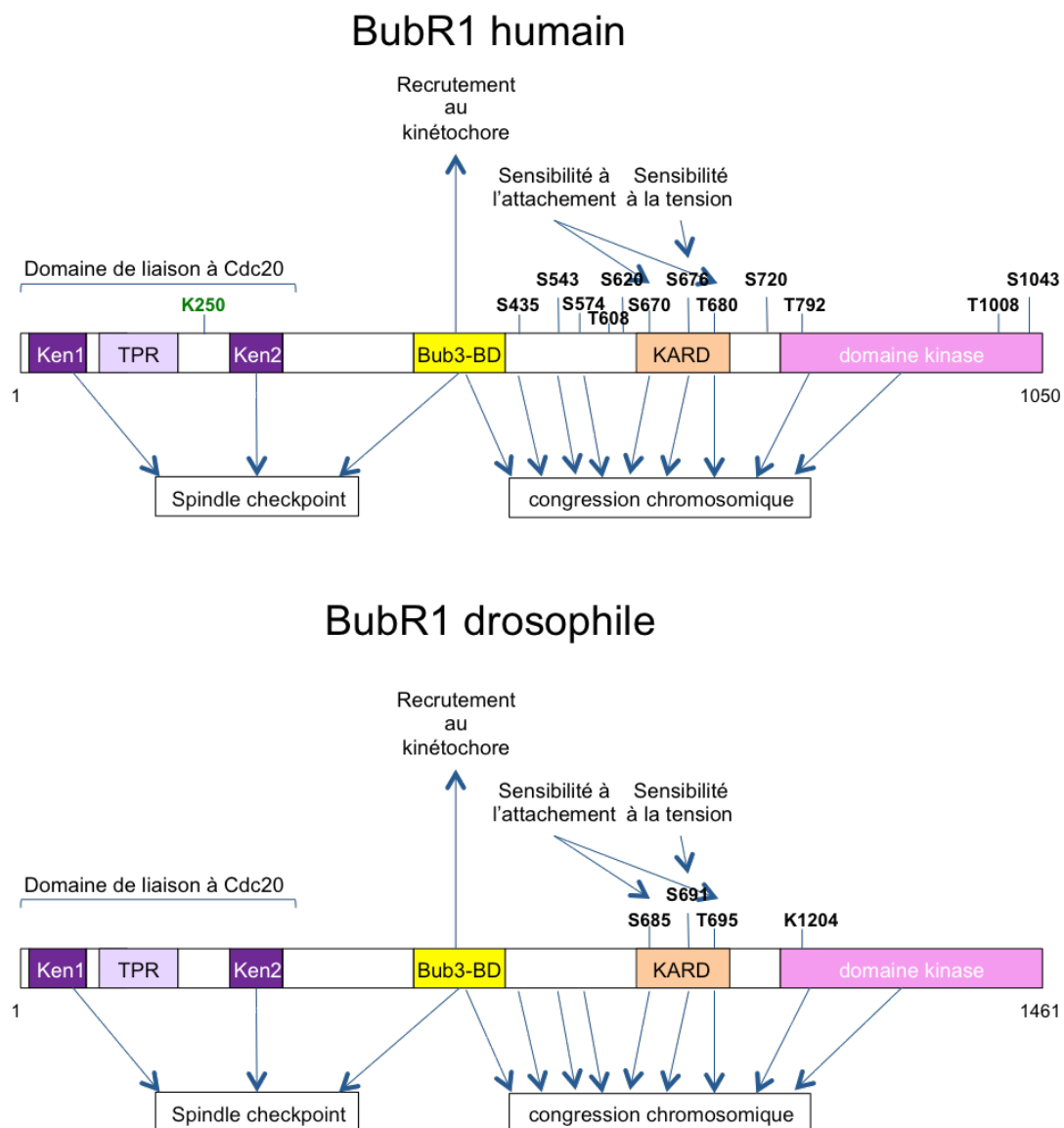


Figure 7 : Schéma des régulations de BubR1 chez l'humain (en haut) et chez la drosophile (en bas). Sont indiqués en noir les sites de phosphorylations connus

pour ces deux organismes, et en vert (pour BubR1 humain) le site d'acétylation/sumoylation connu. Sont également indiqués les rôles des domaines ou des phosphorylations si connu, ainsi que les grandes fonctions en mitose dans lesquelles ils interviennent.

6) Les dommages à l'ADN et leur réparation

a) **Les différentes lésions de l'ADN existantes**

L'intégrité du génome est en permanence menacée par les agressions de l'environnement. Celles-ci peuvent provenir de sources naturelles (rayonnement solaire, radioactivité naturelle) ou de sources artificielles (certains produits chimiques, rayonnements ionisants), ainsi que de sources internes à notre organisme, comme la production d'espèces réactives de l'oxygène (*Reactive Oxygen Species* ou ROS) liée à notre métabolisme. Les dommages occasionnés à l'ADN peuvent se diviser en deux classes, les mutations ponctuelles et les cassures double brin, que nous allons détailler ci-après.

i. Les mutations ponctuelles

Ces mutations sont issues du remplacement d'une base par une autre effectué par l'ADN polymérase au cours de la réplication du génome. Elles peuvent survenir à la suite de différents événements, et avoir différentes conséquences au niveau de la cellule, dont voici quelques exemples.

Tout d'abord, il peut s'agir d'une erreur de la polymérase au cours de la duplication du génome, qu'elle n'a pas corrigée avec son activité *proofreading* (3'→5' exonuclease). Cela va occasionner un mésappariement, qui sera réparé par le système de réparation des mismatches (*Mismatch Repair*, ou *MMR* (Iyer et al., 2006; Larrea et al., 2010)), qui détectera le brin néosynthétisé du brin matrice, par un mécanisme que nous n'aborderons pas ici.

Ensuite, il peut s'agir d'un mutagène physique, comme, par exemple, les UV qui vont entraîner une modification de certaines bases de l'ADN sous leur action. Dans ce cas précis, c'est la formation de dimères de thymine, qui va bloquer la

réplication de l'ADN si ils ne sont pas éliminés par le *Nucleotide Excision Repair* ou NER, puis remplacés (Guo et al., 2010; Laat et al., 1999).

Il peut également s'agir d'un mutagène chimique, comme l'Ethyl Methane Sulfonate, ou EMS, qui va alkyler les guanines de l'ADN. Si elles ne sont pas remplacées par le système de réparation, elles seront reconnues comme des adénines et donc remplacées par celles-ci lors de la réplication, modifiant ainsi la séquence initiale. Dans les mutagènes chimiques, de nombreux produits du métabolisme, comme les espèces actives de l'oxygène (ROS), ou les radicaux libres, peuvent également modifier les nucléotides et entraîner des mutations de trois types. Des mutations de type faux sens qui remplace un acide aminé par un autre dans la protéine, non sens qui ajoute un codon stop qui va interrompre prématurément la séquence protéique, et silencieuse qui n'a aucun effet sur la protéine.

Ces mutations, selon qu'elles soient dans une séquence codante ou non, ou qu'elles altèrent ou non la séquence protéique, peuvent avoir des conséquences diverses sur la cellule. En effet, selon le gène qui sera muté, la protéine fabriquée pourra très bien conserver sa fonction comme la perdre, devenir dominante-négative ou active en permanence.

ii. Les cassures double brin

Les cassures double brin sont un type de lésion de l'ADN qui entraîne une rupture complète des deux brins d'ADN complémentaires antiparallèles formant notre matériel génétique. Ce dernier étant organisé en chromosomes, cela va libérer deux fragments de chromosome, l'un centrique (portant le centromère) et l'autre acentrique, qui, si la lésion n'est pas réparée, ne pourront ségréger avec le reste du chromosome, formant des cellules filles aneuploïdes. Cela peut conduire à des remaniements chromosomiques dans le cas de cassures multiples qui seraient incorrectement réparées (Ciccia and Elledge, 2010), et à la tumorigénèse (Hanahan and Weinberg, 2011). C'est pourquoi ce type de dommage à l'ADN est considéré comme étant le plus délétère pour les cellules. Les deux fragments d'ADN ainsi générés doivent être rapidement protégés, par des complexes protéiques afin de ne pas subir l'action d'exonucléases, et réparés, afin de limiter les conséquences cellulaires de cette lésion.

Ces cassures sont provoquées par de nombreuses causes, parmi lesquelles l'action de métabolites cellulaires sur l'ADN et des agents environnementaux comme les rayonnements ionisants, par exemple le rayonnement X (Lindahl, 1993). Il est donc important pour la cellule de pouvoir détecter et réparer ces cassures afin d'en minimiser les conséquences sur sa survie.

Il existe également des situations où des cassures double brin sont créées de manière physiologique et extrêmement régulée, par exemple pour augmenter le brassage génétique en méiose, par la recombinaison méiotique, qui permet des échanges de portions de chromosomes entre chromosomes homologues par cassure/reliation. Elle est essentielle pour la fertilité de la plupart des organismes sexués (de Massy, 2013). Mais elle l'est aussi pour augmenter la diversité des épitopes reconnus par nos lymphocytes et anticorps, par le système VDJ (Dreyer and Bennett, 1965; Jung and Alt, 2004), qui en recombinant des portions de gènes (en cassant et reliant des séquences dans ces gènes de manière aléatoire) permet de générer une variabilité plus importante.

Ces dernières observations montrent donc qu'il existe un système suffisamment efficace permettant de réparer ces cassures. L'objectif est que la cellule puisse tirer un avantage sélectif à avoir des mécanismes générant ces cassures, et puisse survivre à ce type de dommages quand il n'est pas régulé. Cela fait partie d'un ensemble qu'on appelle le *DNA Damage Response* (DDR), qui concerne tous les types de cassure, et qui sera l'objet des parties qui vont suivre.

b) Le point de contrôle des dommages à l'ADN

Le point de contrôle des dommages à l'ADN, ou *DNA Damage Checkpoint*, a pour rôle de détecter la présence de lésions de l'ADN dans la cellule, et de ralentir le cycle cellulaire jusqu'à leur réparation par les mécanismes adaptés. Il intervient, entre autres, en activant la transcription d'un certain nombre de cibles qui permettront la prise en charge de la cassure (Lowndes and Murguia, 2000), et en recrutant des protéines permettant sa réparation (Cortez et al., 1999). Ces deux mécanismes seront

décrits dans la prochaine partie. Si la réparation n'est pas possible, le point de contrôle induira l'apoptose de la cellule via p53 (Hirao et al., 2000, 2002).

Ses acteurs et mécanismes d'action sont très conservés de la levure *S. cerevisiae* à l'Homme, ce qui en a permis une étude plus complète.

Le *DNA Damage Checkpoint* comprend plusieurs classes de protéines, des senseurs qui vont détecter la cassure, des transducteurs qui vont transmettre et amplifier le signal, et des effecteurs qui vont agir sur la cellule elle-même, et induire des conséquences biologiques à cette cassure (arrêt du cycle cellulaire, réparation...). Il est désigné de différentes manières selon le moment où il intervient dans le cycle cellulaire (*G1 DNA Damage checkpoint*, *S DNA Damage checkpoint*, *G2/M DNA Damage checkpoint*), mais l'essentiel de ses acteurs est conservé. Il existe uniquement quelques variations dans le recrutement de certains acteurs, en particulier les senseurs directement au contact de la lésion, comme présenté dans certaines études (Falck et al., 2005), d'où le fait d'aborder le *DNA Damage Checkpoint* sous l'approche globaliste « du point de contrôle », et non « des points de contrôles ».

La première mise en évidence de ce point de contrôle et d'un de ses éléments, Rad9, a été réalisée à la fin des années 90 (Hartwell and Weinert, 1989; Weinert and Hartwell, 1988). Nous nous focaliserons ici essentiellement sur sa dynamique lors de cassures double brin, et lors de la transition G2/M, qui nous intéresse plus particulièrement.

i. Mise en place du point de contrôle des dommages à l'ADN en G2/M

Lors d'une cassure double brin, le complexe senseur Mre11-Rad50-Nbs1 (MRN) va reconnaître les lésions (Petrini and Stracker, 2003) par sa sous-unité Rad50 et s'y localiser (Moreno-Herrero et al., 2005). Nbs1 va ensuite recruter ATM, une kinase liée aux phosphoinositides 3-kinase (comme ATR et DNA-PK dont nous parlerons plus loin), aux lésions (Falck et al., 2005; You et al., 2005), dans un état phosphorylé ou qui va s'autophosphoryler sous l'effet du recrutement à la cassure (ce point est sujet à débat, voir Kozlov et al., 2006). ATM va ensuite déclencher l'essentiel de la réponse à l'ADN endommagé par l'intermédiaire de phosphorylations, via deux voies de signalisation, l'une par Mdc1, 53BP1

(homologue de Rad9 chez la levure), via RNF8 et RNF168 (Bohgaki et al., 2013)) et BRCA1 et l'autre par Rad17 et ATR (Rad24 chez la levure). Ce mécanisme est indispensable à la signalisation du point de contrôle.

En ce qui concerne la voie faisant intervenir entre autres Mdc1, c'est la phosphorylation de H2AX par ATM qui va permettre le recrutement de Mdc1 (Lee et al., 2005; Stucki et al., 2005). La phosphorylation de H2AX se diffuse autour de la cassure, ce qui va y entraîner des réarrangements de la chromatine, et faciliter la réparation de l'ADN, combiné avec le recrutement de 53BP1 et BRCA1 (Bekker-Jensen et al., 2005; Stucki and Jackson, 2006).

Des signaux globaux de compaction de la chromatine sont aussi régulés, comme KAP-1 (Ziv et al., 2006), ou les histones déacétylases (HDAC, Kim et al., 1999). ATM et le complexe MRN sont également essentiels pour activer la signalisation dépendante d'ATR, et pour la résection des cassures double brin (qui consiste en la génération d'un fragment d'ADN simple brin débordant, recouvert de la protéine RPA). Ce mécanisme est nécessaire à la réparation par recombinaison homologue (Jazayeri et al., 2006). Cette résection des cassures double brin permise par ATR est par ailleurs restreinte aux phases S et G2 du cycle cellulaire, car CDK-dépendante. ATR va également activer, par phosphorylation, Rad17 qui va activer la Claspin, qui va activer à son tour Chk1, une protéine du point de contrôle surtout active en phases S et G2 (Liu et al., 2006; Lukas et al., 2001). C'est l'action de la Claspin par phosphorylation de Cdc25A qui entraîne son ubiquitylation par SCF^{βTrCP} et sa dégradation par le protéasome (Busino et al., 2003; Jin et al., 2003; Kanemori et al., 2005), ce qui a pour conséquence d'inactiver Cdk1 ou Cdk2 (selon la phase du cycle), en synergie avec l'activité de Wee1, et de participer à l'arrêt du cycle cellulaire.

Il a également été montré, tout d'abord chez la levure, que lors du point de contrôle G2/M, CDC5 (homologue de Plk1 chez l'Homme), est inhibé par Rad53 (une autre protéine du point de contrôle, dont l'homologue est Chk2 chez les métazoaires)(Cheng et al., 1998), qui est phosphorylée par ATM. Cela a ensuite été montré sur cellules humaines et *in vitro*, lors d'une exposition à des radiations ionisantes (Matsuoka et al., 2000). Rad53/Chk2 est active à tous les points de

contrôles de dommage à l'ADN au cours du cycle, contrairement à Chk1 (Lukas et al., 2001). Cette inhibition va permettre de conserver un taux élevé de Clb-Cdc28 (homologue de Cycline B1-Cdk1 chez les métazoaires), de manière à empêcher la survenue de l'anaphase et la sortie de mitose (Cheng et al., 1998). Ce modèle de coopération entre Chk1 et Chk2 permettrait un arrêt plus efficace du cycle (Sanchez et al., 1999).

Les autres modes d'induction du point de contrôle fonctionnent sur un principe similaire et partagent des acteurs clefs, comme ATR (par exemple lors de cassures simple brin ou de fourches de réplifications bloquées, Shiloh, 2003).

Le recrutement via des inducteurs (les senseurs) a lieu aux lésions par des motifs conservés dans Nbs1, ATRIP et Ku80, qui sont requis pour l'interaction avec ATM, ATR et DNA-PK, et critiques pour le DDR.

ii. Régulation de la réparation de l'ADN par le point de contrôle

Le point de contrôle des dommages à l'ADN n'est pas systématiquement activé en cas de cassure. De plus, il semblerait que de faibles niveaux de dommages à l'ADN (à l'exception des cassures double-brin sur lesquelles nous nous focalisons) n'activent pas le signal du point de contrôle, vraisemblablement car les dommages sont réparés rapidement et efficacement. Ils ne causent donc pas de problème pour la poursuite du cycle.

Cependant, dans les cas où le point de contrôle des dommages à l'ADN est activé, celui-ci peut interagir avec les systèmes de réparation et ainsi réparer de manière plus efficace.

La plupart des acteurs des systèmes de réparation de l'ADN sont effectivement exprimés de manière constitutive, mais cela n'empêche pas la présence de nombreuses régulations de ceux-ci par le checkpoint.

On sait que le complexe senseur du point de contrôle, Mre11-Rad50-Nbs1 est nécessaire à la réparation des cassures double brin (Carney et al., 1998). De plus, lors d'une cassure double brin, le point de contrôle permet la relocalisation de protéines intervenant dans la réparation des dommages sur le site de cassure. On peut citer les

exemples de Sir et Ku, du système de réparation par jointure d'extrémités non homologues (*Non Homologous End Joining*, ou NHEJ), où le point de contrôle a été montré également comme n'étant pas nécessaire à la réparation (Martin et al., 1999; McAinsh et al., 1999; Mills et al., 1999) ou BRCA1, qui est indispensable pour recruter efficacement le système de réparation par recombinaison homologue (HR) (Powell and Kachnic, 2003).

Enfin, il a été mis en évidence que p53R2, une sous-unité de la ribonucléotide réductase (dont le rôle est de produire des désoxyribonucléotides, et qui est donc nécessaire à la synthèse d'ADN) est induite par p53 en réponse aux dommages à l'ADN. En effet, bloquer son expression induit une mortalité cellulaire plus importante lors de l'exposition à des mutagènes, confirmant son rôle dans la réparation (Tanaka et al., 2000). Sachant que p53 est régulée par le point de contrôle des dommages à l'ADN via Chk2 (Hirao et al., 2000), cela lie l'activation de ce point de contrôle à l'expression de p53R2 lors de lésions à l'ADN.

Le rôle du point de contrôle sur les systèmes de réparation de l'ADN semble être d'augmenter l'efficacité de la réparation, mais n'est pas directement nécessaire à la réparation en elle-même (seul le complexe senseur semble l'être).

iii. Récupération à la suite de la réparation des dommages

Le phénomène appelé « récupération » à la suite des dommages à l'ADN est l'ensemble des modifications métaboliques nécessaires à la reprise du cycle cellulaire normal, après un arrêt lié au point de contrôle des dommages à l'ADN, et une réparation complète des dommages.

Peu de choses étaient connues à propos de cette étape jusque récemment. Il sera traité ici essentiellement de la récupération suite à un arrêt lié au point de contrôle en G2/M.

Après réparation des dommages à l'ADN, les complexes senseurs des cassures liés au point de contrôle situé sur l'ADN, au niveau de la cassure, sont dissociés. Les acteurs principaux du point de contrôle que sont notamment ATM, γ H2AX, Chk1 et 2 sont déphosphorylés et donc inactivés par Wip1 sous l'action de p53 (mais aussi par

PP2A pour Chk1 et γ H2AX, (Chowdhury et al., 2005; Leung-Pineda et al., 2006)), afin de permettre la récupération (Le Guezennec and Bulavin, 2010; Lu et al., 2005a, 2008). Ceci va entraîner, par un mécanisme mal connu, la réactivation de Aurora A, couplée au facteur Bora, et conduire à l'activation de Plk1 par phosphorylation (Macûrek et al., 2008). Plk1 va ensuite inhiber Chk1 et phosphoryler Chk2 et 53BP1, ce qui va inhiber leur fonction dans le point de contrôle (van Vugt et al., 2010), et indirectement Claspin et Wee1 (un inhibiteur de l'entrée en mitose).

Les phosphorylations sur Claspin et Wee1 vont constituer des phosphodegrons, qui vont être reconnus par SCF ^{β TrCP}, une ubiquitine ligase. Celle-ci va ubiquitinyler Claspin et Wee1, entraînant leur dégradation par le protéasome (Mailand et al., 2006; Mamely et al., 2006; Peschiaroli et al., 2006; Watanabe et al., 2004). Cela va permettre l'accumulation de Cdc25A qui ne sera plus dégradée, n'étant plus phosphorylée par Claspin (par ce même mécanisme de phosphodegrons). L'accumulation de Cdc25A va alors entraîner la déphosphorylation et par là même l'activation de Cdk1 (qui n'est plus inhibée par Wee1). Cette réactivation du complexe Cycline-B-Cdk1 est potentialisée par un niveau résiduel de CyclineA-Cdk2 qui persiste au cours de l'arrêt du cycle (car l'inhibition de Cdk2 par Wee1 serait moins efficace que celle de Cdk1 (Chow et al., 2003)), et régule un facteur de transcription, FoxM1, qui permet entre autres d'augmenter la transcription de la Cycline B et de Plk1 (Alvarez-Fernández et al., 2010). La présence du complexe Cycline B-Cdk1 actif va ainsi entraîner la transition G2/M (montré notamment chez le Xénope).

iv. Adaptation au point de contrôle

Le point de contrôle des lésions à l'ADN, en particulier dans le cas du point de contrôle G2/M, est considéré comme transitoire, et ne peut constituer un arrêt prolongé. En effet, il existe un phénomène dit d'adaptation au point de contrôle, qui permet, dans certains cas, la réentrée spontanée dans le cycle de cellules n'ayant pas réparé leur ADN, et conduisant à de l'instabilité chromosomique en mitose (Deckbar et al., 2007; Galgoczy and Toczyski, 2001; Krempler et al., 2007). Il a d'abord été mis en évidence chez la levure à la suite de différents types de dommages à l'ADN

(Malone and Esposito, 1980; Sandell and Zakian, 1993; Toczyski et al., 1997), puis chez le Xénope et les cellules de mammifères (Bartek and Lukas, 2007; Clémenson and Marsolier-Kergoat, 2009; Syljuåsen et al., 2006).

Nous avons également observé cette situation au laboratoire, sur notre modèle de neuroblaste issu de larve de troisième stade de drosophile, dont la conséquence est justement, dans le cadre de cassures double brin non réparées, la création de fragments de chromosomes et du tether que nous observons. Nous y reviendrons dans les objectifs de la thèse.

On pense que ce système a été sélectionné par l'évolution puisqu'il permet à un organisme unicellulaire comme la levure, dans une situation où la réparation des lésions à l'ADN est impossible ou que les lésions sont persistantes, de tenter tout de même de poursuivre le cycle cellulaire et éventuellement survivre, plutôt que de mourir. Ce processus étant nécessaire pour une viabilité complète dans le cas de lésions à l'ADN persistantes, on peut imaginer qu'une réparation de l'ADN lente ou différée après l'adaptation aide à cette viabilité (Galgoczy and Toczyski, 2001).

Par contre, aucune hypothèse n'est émise concernant l'intérêt de la conservation de l'adaptation chez les eucaryotes pluricellulaires supérieurs, où par contre cela pourrait conduire à la mort de l'organisme tout entier suite à un processus de tumorigénèse découlant de ces dommages (Harrison and Haber, 2006; Kastan and Bartek, 2004). Ce processus requiert un nombre important de protéines liées à la régulation de la chromatine et à la recombinaison comme Ku70, Ku80, Rad51, Rad53/Chk2 (Lee et al., 1998, 2003; Pellicioli et al., 2001), mais dépend aussi de protéines du point de contrôle et de kinases mitotiques, comme Plk1 et Chk1 (Syljuåsen et al., 2006). De plus, la survenue de l'adaptation est favorisée par la mutation ou l'absence d'autres protéines comme Mre11/Rad50 (Lee et al., 1998). Son but est d'inactiver les protéines du point de contrôle qui permettent l'arrêt du cycle cellulaire par le mécanisme suivant.

A un moment donné, d'une manière qui n'a pas encore été caractérisée (on ne sait en particulier pas si ATM est déphosphorylée ou non), Plk1 phosphoryle Claspin, ce qui va entraîner sa dissociation de la chromatine ainsi que sa dégradation, et va

atténuer la signalisation de Chk1. En parallèle, Wip1, une phosphatase de la famille PP2C qui s'est accumulée au cours du temps depuis l'activation du point de contrôle de manière p53 dépendante, va déphosphoryler et inactiver plusieurs composants et cibles de la signalisation du point de contrôle, comme p53, p38, Chk1 et Chk2 (l'accumulation de Wip1 au fur et à mesure va déstabiliser la balance entre phosphorylation activatrice et déphosphorylation inhibitrice à la façon d'un rétrocontrôle négatif) (Fujimoto et al., 2005; Lu et al., 2005b; Oliva-Trastoy et al., 2007; Takekawa et al., 2000).

On peut aussi supposer que, comme lors de la récupération, une dégradation de Chk1 par phosphorylation formant un phosphodegron soit possible. Ceci va permettre l'adaptation et la poursuite du cycle cellulaire après un certain délai, ce qui tendrait à suggérer des étapes supplémentaires non encore identifiées dans ce processus (Yoo et al., 2004).

c) Les différentes voies de réparation des cassures double brin

Il existe de nombreuses voies de réparation des dommages à l'ADN. Nous ferons tout d'abord un rapide tour d'horizon de l'ensemble des systèmes de réparation qui existent, puis nous nous focaliserons ensuite sur les systèmes de réparation des cassures double-brin.

La cellule pouvant être à tout moment la cible de dommages variés (comme vu précédemment), il a été mis en place au cours de l'évolution de nombreux systèmes spécialisés pour réparer les différents types de lésions que l'ADN peut subir, tant par des mutations ponctuelles que par des cassures double brin.

Il existe, chez les eucaryotes supérieurs, quatre systèmes principaux de réparation de lésions simple brin, et trois systèmes de réparation des cassures double brin.

Chacun des systèmes de réparation des lésions simple brin est spécialisé dans un type de dommage particulier. Il y a en effet :

- Le *Direct Repair* ou *Direct Reversal* (DR), qui a pour but d'éliminer des groupes chimiques simples (méthyles, éthyles...) qui ont été ajoutés sur les guanines de l'ADN par des agents alkylants. Il consiste en une enzyme suicide, MGMT, qui va capturer le groupe chimique et être dégradée (Sedgwick et al., 2007). Il existe aussi une photolyase qui peut réparer les dommages liés aux UV, comme les dimères de thymine, mais celle-ci n'est pas présente chez l'Homme tout comme chez de nombreux organismes. Elle est par contre présente chez la drosophile (Sancar, 2003).
- le *Base Excision Repair* (BER), qui répare les bases ayant des altérations chimiques, les lésions les plus communes dans l'ADN, qui ne perturbent pas la structure de la double hélice d'ADN. Il possède deux sous-systèmes, selon que la lésion touche une ou plusieurs bases (Almeida and Sobol, 2007; Hegde et al., 2008; Wilson III and Bohr, 2007).
- Le *Nucleotide Excision Repair* (NER), qui répare de nombreux types de lésions locales sur les nucléotides, formant de gros adduits qui entraînent une déstabilisation de la double hélice. Ces dommages peuvent être issus des UV (dimères de thymine en absence de photolyase), de mutagènes chimiques et d'agents de chimiothérapie (Gillet and Schärer, 2006; Hoeijmakers, 1993; Leibel et al., 2006). Il fait intervenir de nombreux acteurs selon deux modes d'action, l'un couplé à la transcription, le TC-NER, et l'autre intervenant sur le génome entier, le GG-NER.
- Le *Mismatch Repair* (MMR), quant à lui, répare les mésappariements. Ce sont des erreurs de réplication entraînant le remplacement du nucléotide complémentaire à celui correspondant sur le brin répliqué par un autre (Jiricny, 2006). Il répare également les mutations par insertion/délétion.

Par opposition aux systèmes de réparation des lésions simple brin, les systèmes de réparation des cassures double brin ne sont pas spécialisés par type de dommage, et peuvent donc dans certaines conditions être actifs en même temps. Par contre, il est à noter dans le cas du système de réparation par recombinaison

homologue, que son activité est temporellement limitée de par son mode de fonctionnement. Nous allons maintenant détailler ce dernier, de même que ceux des deux autres systèmes de réparation des cassures double brin.

i. La recombinaison homologue (HR)

Le système de recombinaison homologue repose sur la possibilité de pouvoir réparer les cassures double brin en se servant d'une chromatide homologue pour matrice (chromatide sœur ou chromatide du chromosome homologue) (Lankenau, 1995). Ce système permet ainsi de ne perdre aucune information de séquence, par contre, son fonctionnement est donc cantonné entre les phases S et G2 du cycle cellulaire. Il répare environ 10% des cassures double brin chez les mammifères (Kanaar et al., 2008). Lors d'une cassure double brin, le complexe MRN va être recruté au niveau de la lésion (comme nous l'avons vu lors de la description du point de contrôle des dommages à l'ADN). Celui-ci va permettre de maintenir les deux fragments cassés ensemble (de Jager et al., 2001). ATM et ATR seront ensuite recrutés, et vont phosphoryler et recruter BRCA1 aux cassures.

Le contrôle du cycle via ATR est indispensable pour que la recombinaison homologue se produise correctement (LaRocque et al., 2006). A la suite de la mise en place du point de contrôle des dommages à l'ADN, BRCA1 va recruter BRCA2, RAD51 et BARD1 (Greenberg et al., 2006). BRCA2 en particulier a été montré comme étant nécessaire à la recombinaison homologue (Klovstad et al., 2008). La nucléase CtIP et l'exonucléase 1 (EXO1) vont ensuite être assemblés aux cassures et réaliser la résection de celles-ci, en générant un simple brin débordant de chaque côté de la lésion (Limbo et al., 2007; Mimitou and Symington, 2008; Moreau et al., 2001; Sartori et al., 2007). Ces simples brins vont être transitoirement protégés par la protéine RPA, lors du recrutement de RAD51 sur ceux-ci, permis par BRCA2 (Esashi et al., 2005). RAD51 et d'autres protéines de la famille RAD52 vont former ainsi un complexe avec l'ADN, qui va permettre l'invasion du fragment cassé sur la chromatide sœur homologue, créant ainsi un triplex d'ADN où l'échange de brin va se produire (Symington, 2002; Wyman et al., 2004).

Ce mécanisme d'invasion/échange de brins met en jeu un grand nombre d'acteurs pour fonctionner, dont la famille d'hélicases RecQ. Cette dernière comprend l'hélicase Blm/Mus309 (Hickson, 2003; Weinert and Rio, 2007) dont le rôle est également d'empêcher la recombinaison avec des séquences trop divergentes, et ainsi préserver l'intégrité du génome (Kappeler et al., 2008). Un complexe comprenant des résolvas, dont RAD51-XRCC3, Mus81, Eme1 et Eme2 va, enfin, traiter les intermédiaires de recombinaison générés par l'invasion/échange de brins et permettre la résolution des jonctions de Holliday, afin de finir de réparer la cassure et libérer la chromatide « matrice » et la chromatide réparée (Abraham et al., 2003; Ciccio et al., 2003; Liu et al., 2004), Figure 8, volet a.

ii. La jonction des extrémités non-homologues

Le système de réparation par jonction des extrémités non-homologues, ou *Non Homologous End Joining* (NHEJ), est le système de réparation des cassures double brin prédominant chez les eucaryotes supérieurs, contrairement à la levure où la recombinaison homologue domine (Guirouilh-Barbat et al., 2004). Cette voie est surtout active en G1, quand la recombinaison homologue n'est pas possible. Elle est essentielle pour la génération d'une grande variabilité de récepteurs de cellules T et d'anticorps chez les vertébrés, par le système V(D)J. Elle a pour rôle de rattacher les fragments doubles brins nus entre eux et n'a pas besoin de matrice homologue. De ce fait, en cas de multiples fragments cassés, elle peut générer des réarrangements chromosomiques.

Les protéines principales essentielles à ce mécanisme sont les sous-unités Ku : Ku70 (Irbp chez la drosophile) et Ku80, la DNA-PKcs, XRCC4, l'ADN ligase IV (LigIV), Artemis et NHEJ1. Ku70 et Ku80 vont être recrutées aux cassures double brin par le complexe MRN, après mise en place du point de contrôle des dommages à l'ADN, et vont recruter DNA-PKcs pour former le complexe DNA-PK. Cet ensemble va pouvoir maintenir les extrémités de la cassure l'une avec l'autre (Chen et al., 2001; DeFazio et al., 2002; Zha et al., 2009). DNA-PKcs va alors être activée, s'autophosphoryler, et phosphoryler les sous-unités Ku, p53, H2AX, Artemis, XRCC4 et WRN (Collis et al., 2004). Artemis va ensuite former un complexe avec DNA-PKcs et être phosphorylée par DNA-PK, ce qui va l'activer et lui permettre de

modifier les fragments 5' et 3' de part et d'autre de la cassure double brin. La conséquence de cette étape est que le NHEJ peut alors induire des erreurs et des insertions/délétions dans le génome (Burma et al., 2006; van Gent and van der Burg, 2007; Weterings and van Gent, 2004). Les fragments vont ensuite être reliés entre eux par le complexe LigIV/XRCC4, ce qui va permettre de terminer la réparation de la lésion, voir Figure 8, volet b.

iii. L'hybridation simple brin

L'hybridation simple brin, ou *Single Strand Annealing* (SSA), est un mécanisme de réparation à mi-chemin entre la recombinaison homologue et la jonction des extrémités non-homologues.

Une hélicase, Srs2, déroule les brins des deux fragments au niveau de la cassure, à partir des extrémités 5' (Pâques and Haber, 1997). Ensuite, celles-ci sont digérées par une exonucléase, probablement le complexe MRN (Carney et al., 1998; Ivanov et al., 1996; Paull and Gellert, 1998; Trujillo et al., 1998), de manière à exposer une région d'homologie. Les extrémités non-homologues en 3' sont ensuite éliminées par le complexe Rad1/Rad10 (ERCC-4 et ERCC-1 chez la drosophile et les mammifères (van Duin et al., 1986; Sekelsky et al., 2000)) en présence des protéines Msh2 et Msh3, selon la taille de la région d'homologie (Ivanov and Haber, 1995; Saparbaev et al., 1996; Sugawara et al., 1997). Par la suite, les deux brins sont accolés par leur région d'homologie. Une étape de synthèse des nucléotides manquants dans la zone d'homologie et une ligation des deux fragments va ensuite compléter la réparation. De part son fonctionnement, en éliminant des nucléotides jusqu'à trouver une région d'homologie, ce mécanisme est non conservatif et va entraîner des délétions, jusqu'à plusieurs kilobases (Sugawara et al., 2000), voir Figure 8, volet c.

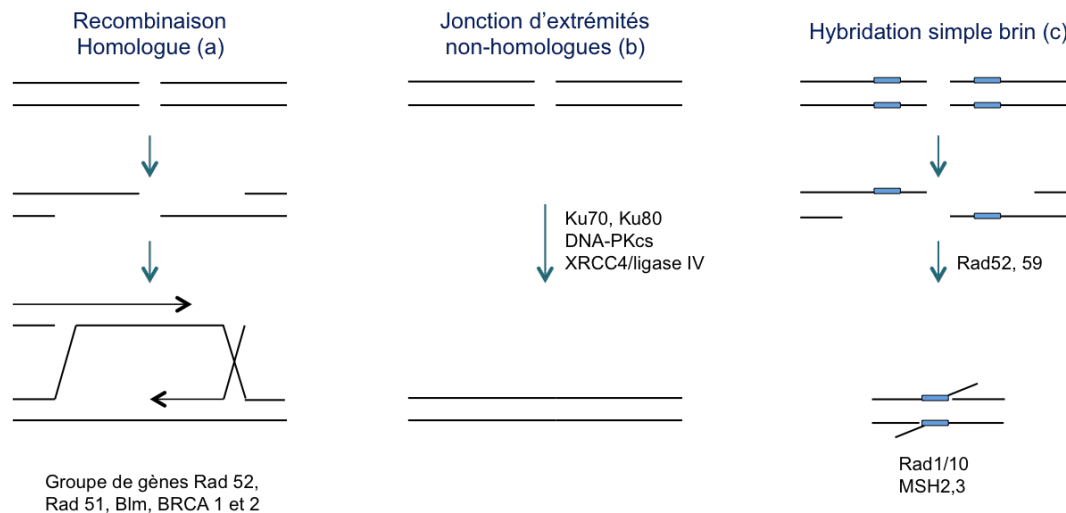


Figure 8 : Les différents systèmes de réparation des cassures double brin : Recombinaison Homologue (HR), Jonction d'extrémités non-homologues (NHEJ), et Hybridation simple brin (SSA).

d) La réparation des dommages à l'ADN en mitose

Les dommages à l'ADN se produisent de manière aléatoire tout au long de la vie de la cellule, et il est ainsi possible que ceux-ci se déroulent au cours de la mitose.

La première recherche d'un mécanisme actif de réparation de l'ADN en mitose a été réalisée par Barbara McClintock en 1942 (McClintock, 1942).

En effet, elle avait noté que chez le maïs lorsque des chromosomes sont cassés dans un seul noyau, il se produit des fusions entre les fragments cassés (McClintock, 1941). Elle a donc créé des fusions nucléaires (de deux noyaux différents) en utilisant des noyaux de gamètes de maïs portant chacun un chromosome cassé, qu'elle a fusionnés. Elle a ainsi observé des cycles de cassure/fusion des chromosomes au fil des divisions cellulaires, formant dans certains types cellulaires (cellules de l'endosperme) des dicentriques alors que dans d'autres (sporophyte, cellules zygotiques) les cassures sont réparées. Cela est dû au fait que dans un cas, quand plusieurs cassures sont présentes, une fusion peut avoir lieu entre plusieurs extrémités libres, alors que dans l'autre cas, lorsqu'il n'y en a qu'une seule, cela entraîne sa réparation.

Elle a également montré que des chromosomes cassés n'avaient pas besoin d'être en contact au moment de la cassure pour fusionner, présageant un mécanisme de réparation actif. Par la suite, il a été supposé chez les vertébrés que les cassures double brin ne sont pas réparées au cours de la mitose (Zirkle and Bloom, 1953). Ceux-ci ont observé des cellules de cœur d'amphibien irradiées aux protons en microscopie à contraste de phase, et remarqué que les dommages n'y étaient pas réparés en mitose. Cependant, leur approche a ensuite été remise en cause, car leur protocole utilisait un rayon trop large, et pouvait donc potentiellement induire des dommages tels que leur réparation aurait été de toute manière impossible.

Il a plus récemment été montré, dans un autre modèle de vertébré (cellules PtK), qu'il y aurait une absence de réparation des cassures à partir de la fin de la prophase, après le passage du point de contrôle des dommages à l'ADN, jusqu'à la fin de la télophase (Morrison and Rieder, 2004; Rieder and Cole, 1998). Depuis ce dogme est partiellement remis en cause. En effet, même si les systèmes de réparation de l'ADN sont activement réprimés au cours de cette phase du cycle, on observe la mise en place d'une réponse partielle aux dommages à l'ADN chez les mammifères (Giunta et al., 2010).

Cette réponse partielle est constituée du complexe MRN de détection des cassures (Peterson et al., 2011), mais aussi de protéines qui vont marquer les dommages, telles ATM, DNA-PK, MDC1 ou l'histone H2AX phosphorylée (Giunta et al., 2010; Nakamura et al., 2010; van Vugt et al., 2010). Cependant, celles-ci ne recrutent pas et ne phosphorylent pas les effecteurs et ainsi n'entraîneront pas la réparation du dommage avant l'entrée en phase G1. Cette absence de recrutement des effecteurs a été montrée comme relevant d'un mécanisme actif. Par exemple, on sait que Chk2 subit une phosphorylation inhibitrice de Plk1 en mitose, en plus de ne plus être phosphorylé par ATM, ce qui empêche l'activation du checkpoint des dommages à l'ADN G2/M (van Vugt et al., 2010), tout comme la dégradation de la Claspine (Mailand et al., 2006; Mamely et al., 2006; Peschiaroli et al., 2006) cela entraîne l'inhibition de Chk1, avec la même conséquence.

Certains effecteurs sont également la cible de cette régulation, comme 53BP1, qui ne peut plus se localiser sur les sites de cassure en mitose (Nelson et al., 2009) ou

les CDC25, qui subissent des phosphorylations empêchant leur inhibition par Chk1 et Chk2 et interdisant ainsi un arrêt du cycle cellulaire lié au point de contrôle (Bulavin et al., 2003). RAD51 et BRCA2 subissent également ce type de régulation, par l'action de Plk1 et CDK1 respectivement (Esashi et al., 2005; Yata et al., 2012), montrant que la régulation négative touche aussi le système de réparation par recombinaison homologue (Peterson et al., 2011).

Malgré le blocage de l'activation du point de contrôle des dommages à l'ADN, il a été mis en évidence par la suite sur cellules humaines que dès la fin de la mitose, avant l'entrée en G1, certaines protéines recrutant les systèmes de réparation dont le recrutement était bloqué jusque là, comme RNF8 ou RNF168 sont mobilisées aux sites de cassure. Ceci aurait lieu vraisemblablement pour amorcer le recrutement des effecteurs, comme 53BP1 (Bohgaki et al., 2013; Giunta and Jackson, 2011; Giunta et al., 2010). Ces mêmes auteurs ont montré que cette réponse partielle a malgré tout son importance. En effet, une inactivation transitoire des acteurs de celle-ci entraîne l'hypersensibilité des cellules mitotiques aux agents générant des cassures double brin.

Il a également été mis en évidence un recrutement en mitose d'acteurs spécifiques du NHEJ, sur des cassures double brin induites par laser ablation dans les cellules humaines (Gomez-Godinez et al., 2010) ou par une endonucléase chez le Xénope (Peterson et al., 2011). Malgré cela, la persistance de RPA sur les fragments simple brin débordants issus de la cassure empêche le fonctionnement correct du NHEJ.

De plus, il n'a pas été montré que la ligase IV est fonctionnelle, ce qui tendrait à indiquer que le NHEJ n'est pas fonctionnel. Cependant, aucune raison n'avait été démontrée à ce phénomène d'inhibition des systèmes de réparation jusqu'à ce que récemment, dans des cellules humaines, il fut mis en évidence les conséquences de la réactivation des deux principaux systèmes de réparation des cassures double brin, le *Non Homologous End Joining* (NHEJ) et la recombinaison homologue (HR). En empêchant les phosphorylations inhibitrices de Cdk1 et Plk1 sur RNF8 et 53BP1 respectivement, qui sont des activateurs majeurs de ces deux voies de réparation, en

mutant les sites de phosphorylation appropriés, on permet effectivement à ces deux mécanismes de persister au cours de la mitose.

Ainsi, il a été mis en évidence que leur réactivation entraîne la fusion des télomères des chromatides sœurs. En effet, l'action d'Aurora B en mitose est telle que les télomères seraient moins protégés par les complexes protéiques qui les recouvrent (via son action sur la Shelterin, (Hayashi et al., 2012)). Cette altération de leur protection implique qu'ils soient considérés comme des cassures double brin par la machinerie de réparation (Lee et al., 2014; Orthwein et al., 2014). Cette fusion entraîne la création de chromosomes dicentriques et une aneuploïdie. Prévenir ce phénomène serait donc le rôle de l'inhibition des systèmes de réparation des cassures double brin en mitose. L'extrapolation de ces résultats au modèle drosophile est pour le moment en suspens, les homologues de RNF8, RNF168 et 53BP1 restant à trouver.

En dehors de cette réponse partielle, il avait également été constaté précédemment, dans certains cas de dommages massifs à l'ADN durant la mitose, un délai lors de la transition métaphase/anaphase. Ce point précis est soumis à controverse. Certains ayant trouvé, en cellules humaines, que ce délai est dépendant de Mad2 (Mikhailov et al., 2002). Par la suite, il a été mis en évidence que cet événement dépendant de Mad2 était possiblement lié à l'endommagement des régions centromériques, lui même lié au caractère massif des dommages induits. Ces derniers entraînent alors l'activation du SAC, connu comme pouvant engendrer un tel délai (Musacchio and Salmon, 2007).

D'autres pensent qu'il existe un point de contrôle des dommages à l'ADN pendant la mitose (Su and Jaklevic, 2001). Cette hypothèse est confirmée par des résultats récents (Royou et al., 2005) dans des neuroblastes de larves de troisième stade de Drosophile. Ceux-ci montrent, en faisant varier la quantité de dommages à l'ADN réalisés dans la cellule, deux éléments à considérer en particulier. Premièrement le rôle de BubR1 dans le délai entre métaphase et anaphase lorsque l'on induit des cassures massives par des rayons X (perte de ce délai en mutant BubR1) et seulement dans ce cas. Ils mettent également en évidence le rôle de Grp/Chk1 (qui est impliqué dans le point de contrôle des dommages à l'ADN en fin de phase G2 (Brodsky et al., 2000; Jaklevic and Su, 2004)). Il est nécessaire à ce délai quelque soit

le nombre de cassures (y compris des cassures localisées réalisées par l'action d'une endonucléase, I-CreI).

Cette dualité de situations où l'action de BubR1 et Chk1 (qui ont été montrés comme agissant sur des voies parallèles) est nécessaire pour induire un délai lors de cassures massives et où seulement Chk1 est impliquée lors d'un nombre faible de cassures semble aller dans le sens d'une situation que l'on a décrite plus haut. L'action de BubR1, vraisemblablement via le SAC, aurait lieu lorsque l'on a endommagement des centromères, à la suite de nombreux dommages aux chromosomes, en plus d'une action systématique de Chk1 pour réactiver le point de contrôle de dommages à l'ADN de G2/M lors de la transition métaphase/anaphase.

Cette étude, en analysant plus finement le cas plus physiologique de dommages non massifs à l'ADN, montre donc qu'il existe effectivement un point de contrôle entre métaphase et anaphase, dans lequel intervient la protéine Chk1. On peut alors supposer que ce point de contrôle permettrait à la cellule d'avoir le temps nécessaire à un pré-marquage des cassures double-brin, comme décrit plus haut, avant la survenue de l'anaphase et la réparation éventuelle des dommages au cours de la phase G1 suivante. Ce temps de pré-marquage serait malgré tout limité, un arrêt en mitose trop long entraînant des dommages supplémentaires à l'ADN (Dalton et al., 2007; Ganem and Pellman, 2012).

Un mécanisme de prévention des dommages réparant des structures d'ADN centromérique a également été récemment découvert en cellules humaines ; il existe aussi en cellules d'insecte (Biebricher et al., 2013; Chan et al., 2007). Il est présent au cours de la mitose et jusqu'à la fin de l'anaphase, dans des conditions physiologiques, sur les *Ultra Fine Bridges (UFBs)*. Ces UFB sont essentiellement des filaments d'ADN non recouverts d'histones (ce qui explique leur découverte tardive) qui relient les centromères entre eux lors de la ségrégation des chromosomes en mitose (Baumann et al., 2007; Chan et al., 2007). Il est supposé qu'ils contiennent des caténations non résolues entre les centromères sœurs, qui empêchent la réactivation du SAC en début d'anaphase en maintenant la tension entre les centromères avant de disparaître, résolus par la topoisomérase II α (Wang et al., 2008, 2010). Cette résolution dépend de l'activité hélicase de Blm, qui est recrutée aux centromères par

PICH, toutes deux intervenant dans sa structure (Ke et al., 2011; Rouzeau et al., 2012). Le mécanisme de prévention des dommages dans l'ADN centromérique permet ainsi de décaténer les centromères et permet leur bonne séparation.

Dans tous les cas, l'ensemble de ces systèmes convergent vers un même but : prévenir ou prendre en charge les cassures double brin en mitose, jusqu'à ce que leur réparation soit possible, à l'issue de celle-ci.

C'est ainsi que les « DNA tethers » ont été découverts chez la drosophile. Ce sont des filaments d'ADN qui relient les deux fragments cassés issus d'un même chromosome (Royou et al., 2010). En effet, en générant des cassures double brin dans les chromosomes sexuels via une enzyme, I-CreI, qui coupe dans les répétitions d'ADN_r (Rong et al., 2002), il a été mis en évidence qu'il se formait une structure d'ADN particulière. Elle permet d'aider la partie acentrique (sans centromère) du chromosome, qui n'est pas reliée au fuseau mitotique, à ségréger correctement lors de l'anaphase, bien que plus lentement (Royou et al., 2010). Cette structure a été montrée comme étant recouverte de protéines, en particulier des kinases mitotiques Plk1 (Polo), BubR1, INCENP et Aurora-B. Parmi celles-ci, Plk1 et BubR1 sont nécessaires à la stabilité du tether, à la ségrégation correcte des fragments acentriques, et *in fine* à la survie quand de telles cassures surviennent.

7) Objectifs de thèse

Ce travail de thèse au laboratoire a eu pour but principal de continuer le projet sur le tether d'ADN reliant chromosome centrique et acentrique en mitose, décrit en fin d'introduction (Royou et al., 2010). Ce projet est mené sur des neuroblastes de drosophile, qui sont des grosses cellules se divisant fréquemment dans un modèle idéal pour faire de la génétique, avec un cycle de vie court.

Deux voies ont été considérées pour poursuivre ce travail.

Tout d'abord, essayer de déterminer quel est le mécanisme de réparation de l'ADN intervenant dans la réparation de ces cassures, et participant donc

possiblement à ce tether, parmi les mécanismes de réparation de cassures double brin existants.

Ensuite, déterminer le rôle et la régulation de BubR1, une des protéines nécessaires à ce tether.

Les problématiques abordées ont été les suivantes.

- Comment BubR1 se localise-t-elle au tether : Quels sont les domaines importants pour sa localisation, quelle protéine la recrute ?
- Quelle est son activité au tether : quels domaines de BubR1 sont importants pour celle-ci ? Comment agissent-ils ?

Nous avons tenté de faire progresser les connaissances sur ces questions.

Matériel et Méthodes

1) Matériels et méthodes de l'article 1

a) **Souches de drosophile utilisées**

Les drosophiles ont été élevées sur un milieu composé de farine de maïs et d'extrait de levure dans des conditions standard, à 25°C. Les stocks GFP-Rad21, GFP-Fzy, CenpC-GFP, Nuf2-GFP, Spc105-GFP, GFP-Mad1 et GFP-Mps1 ont déjà été décrits. Le stock H2Az-RFP (précédemment nommé H2Av-RFP) a été obtenu auprès du Bloomington stock center. Le stock transgénique exprimant I-CreI est décrit dans (Rong et al., 2002). Les allèles mutants *bubR1*¹ et *bub3*¹ ont également été décrits. Les stocks exprimant GFP-Securin et les constructions GFP-BubR1 tronquées ont été obtenus de BestGene. Les génotypes des larves utilisées dans ce travail sont listées dans le tableau S1.

b) **Clonage des constructions BubR1 tronquées**

Toutes les constructions sont basées sur un plasmide contenant l'ADNc complet de BubR1 (Buffin et al., 2005), l'utilisation du protocole Gateway (Life Technologies), et une vérification de la construction obtenue par séquençage. Les PCRs ont été réalisées en utilisant les oligonucléotides suivants, et leurs produits insérés dans le vecteur pDONR/Zeo (Life Technologies) afin de créer des clones d'entrée :

BubR1 Full Length: F1-R1

BubR1 Δ 763-1055: Nous avons généré cette construction en réalisant une PCR en deux étapes, avec les oligos F1 Δ 3NTR et Δ 3CTF et R1 pour la première étape, et F1 et R1 pour la seconde.

BubR1 330-1461 : F2-R1

BubR1 1-1063 : F1-R2

BubR1 330-1063 : F2-R2

BubR1 755-1461 : F3-R1

BubR1 330-762 : F2-R4

BubR1 1055-1461 : F4-R1

BubR1 1-337 : F1-R3

BubR1 755-1063 : F3-R2

Séquences des oligonucléotides :

F1:

GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCGACTTTGACAATGCGAAAG
AG

F2:

GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCGACGAACAAGCAATGCCA
CCTATT

F3:

GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCCCGGGTGGTGACAACCTTT
TGCGC

F4:

GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCATAAAAAATTCCACACTGC
TGATC

R1:

GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCCTATTTCTGCAATATCGTGTT
AAACTT

R2:

GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCGATCAGCAGTGTGGAATTTT
TTAT

R3:

GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCCTAAATAGGTGGCATTGCTT
GTTCGTC

R4:

GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCGCGCAAAAAGTTGTCACCAC
CCGG

Δ3NTR:

AGGGATCAGCAGTGTGGAATTTTTTATGCGCAAAAAGTTGTCACCACCCG
G

Δ3CTF:

GAAAAACCGGGTGGTGACAACCTTTTGGCGCATAAAAAATTCCACACTGCT
GATC

Les vecteurs d'entrée contenant les séquences BubR1 tronquées ont été recombinaisonnés dans le vecteur pUb>GFP-GAT dans lequel la construction est sous le contrôle du promoteur ubiquitine et étiqueté en N-terminal avec la GFP. Les plasmides finaux ont ensuite été envoyés à BestGene pour obtenir les lignées transgéniques.

c) Construction des plasmides du substrat synthétique de l'APC/C

Pour générer les constructions GFP-CycBNt-Bub3, nous avons réalisé une PCR en deux étapes. Nous avons utilisé l'oligonucléotide CycBNt-Gat-F (qui contient la séquence Gateway ATTB1) et l'oligonucléotide Bub3-Lnk-CycBNt-R sur le vecteur pDONR/Zeo-CycBNt-Bub3BD précédemment commandé chez Genscript pour obtenir la partie N-terminale de notre construction avec un chevauchement avec la partie C-terminale. Nous avons également utilisé un oligo Lnk-Bub3-F et un oligo Bub3-R (avec une séquence Gateway ATTB2), pour obtenir la partie C-terminale de la construction avec un chevauchement avec la partie N-terminale, à partir du vecteur pBlueScript KS Bub3 (voir partie Clonage des constructions Bub3). Nous avons ensuite relié et amplifié ces deux parties par PCR en utilisant les oligos CycBNt-Gat-F et Bub3-R. La construction a été recombinaisonnée avec le vecteur destination afin d'obtenir le plasmide final pUb-GFP-CycBNt-Bub3. Ce plasmide a été envoyé à BestGene pour transfection.

CycBNt-Gat-F:

GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCGACGAACAAGCAATGCCA
CCTATTggcgccggagctggcgccggagcgATGGCCGCCCTTGAAAAGAAC

Bub3-Lnk-CycBNt-R:

TGGGGGACGgctccggcgccagctccggcgccGCCAGTGGCTGTTTCTTCCA

Lnk-Bub3-F:

ggcgccggagctggcgccggagcgCGTCCCCCAGAGTTCAAGCTTA

Bub3-R:

GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCCTATTATTTCTGTTTAGTTTC
CTGGTC

d) Extraction de l'ADN génomique codant Bub3

L'ADN génomique a été extrait et purifié en utilisant un stock de drosophiles adultes W¹¹¹⁸. Quatre mouches (deux femelles, deux mâles) ont été collectées dans un tube et congelées dans l'azote liquide. Elles ont ensuite été broyées dans 200µL de tampon A fraîchement préparé (100mM Tris-HCl, pH 7,5, 100mM EDTA pH 8, 100mM NaCl, 0,5% (m/v) SDS). 200µL supplémentaires de tampon A ont été ajoutés et la mixture broyée de nouveau jusqu'à ce qu'il ne reste que les cuticules. Le tube a ensuite été incubé à 65°C pendant 30min, et transféré sur de la glace. 800µL de solution LiCl/KAc (1 volume de solution stock 5M de KAc avec 2,5 volumes de solution stock 6M de LiCl) ont été ajoutés au tube, et ce dernier incubé sur la glace pendant minimum 10 minutes. Le tube a été centrifugé à 14000rpm, température ambiante pendant 15min. 1mL de surnageant a été transféré dans un nouveau tube de 2mL, en éliminant les débris flottants. 0.6 volumes d'isopropanol ont ensuite été ajoutés pour précipiter l'ADN, et le tube a été vortexé puis centrifugé pendant 15min à 14000rpm, à température ambiante. Le surnageant a ensuite été éliminé, et le culot lavé avec de l'éthanol 70% (v/v), et séché en utilisant un SpeedVac (Eppendorf) à 30°C pendant 2 minutes. Le culot a été resuspendu dans 50µL d'eau ultrapure et stocké jusqu'à utilisation à -20°C.

e) Clonage des constructions Bub3

Les constructions Bub3 ont été obtenues par clonages multiples. Tout d'abord, les 900nt en amont du codon d'initiation de Bub3 ont été amplifiés à partir d'ADN génomique de drosophile (obtenu en utilisant le protocole « Extraction de l'ADN

génomique codant Bub3 ») en utilisant les oligos suivants, afin d'amplifier le promoteur endogène de Bub3 :

Bub3prom-F: ACTG**ggtaacc**GATCTTCTTGACGGTGCTCACCTGGAG (qui introduit un site de restriction KpnI avant la séquence du promoteur)

Bub3prom-R: ACTG**ctcgag**TTTGTCAAGTTTTCTGCTAGCAACTTG (qui introduit un site de restriction XhoI après la séquence du promoteur)

Le produit de PCR obtenu a ensuite été purifié sur gel d'agarose et cloné par restriction/ligation (les enzymes de restriction sont de New England Biolabs, et la ligase est la Quick Ligase, également de NEB) sur les sites de restriction introduits dans un pBluescript KS (initialement de Stratagene). La séquence du vecteur obtenu a ensuite été confirmée par séquençage.

La séquence génomique de Bub3 avec son 3'UTR a ensuite été amplifiée à partir du même ADN génomique avec ces oligos :

Bub3gen-F: AGCT**cccggg**ATGCGTCCCCCAGAGTTCAAGCTTAAC (qui introduit un site de restriction SmaI avant la séquence Bub3)

Bub3gen-R: CTAT**tctaga**AAAAGCCCAGGTTTATTATGGCCAACG (qui introduit un site de restriction XbaI après la séquence 3'UTR)

Ce produit de PCR a été purifié sur gel d'agarose et cloné dans le vecteur précédent obtenu avec le promoteur Bub3 par restriction/ligation entre les sites de restriction SmaI et XbaI, afin d'obtenir un vecteur avec le promoteur Bub3 et la séquence génomique de Bub3 avec son 3'UTR, confirmée par séquençage.

Ce vecteur a ensuite été modifié pour étiqueter Bub3 avec mRFP. La séquence de mRFP a été amplifiée depuis un vecteur déjà présent au laboratoire (obtenu auprès du laboratoire de R. Karess) en utilisant les oligos suivants :

mRFP-F: ACTG**ctcgag**ATGGCCTCCTCCGAGGACGTC (introduisant un site de restriction XhoI avant la séquence mRFP)

mRFP-R:

actg**cccg**gcgctccggcgccagctccggcgcccCTAGGGGCGCCGGTGGAGTGGC
GGCCCTCG (introduisant un site de restriction SmaI et un linker après la séquence mRFP)

Ce produit de PCR a été purifié sur gel d'agarose et cloné dans le précédent vecteur (Bub3 promoter-Bub3-Bub3 3'UTR), par restriction/ligation entre le promoteur BuB3 et la séquence génomique de Bub3 en utilisant les sites XhoI et SmaI précédemment décrits. Cela nous a permis d'obtenir la construction Bub3 promoter-mRFP-Bub3 avec la mRFP et Bub3 dans le cadre de lecture approprié, dans le vecteur pBluescript KS.

Cette construction a ensuite été transférée dans le vecteur pCaSpeR4 par restriction/ligation avec les sites de restriction flanquants KpnI et XbaI dans un P-element afin de créer des mouches transgéniques (la génération des mouches a été réalisée par BestGene Inc, USA) exprimant RFP-Bub3 sous le contrôle du promoteur endogène.

f) Clonage des constructions GFP-Sécurine et Sécurine-GFP

La séquence de la Sécurine a été amplifiée à partir du vecteur pSecurin contenant l'ADNc de la Sécurine de drosophile, obtenu auprès du DGRC (Ref. LD16810, Bloomington, IN, USA). Les oligos suivants ont été utilisés, afin de cloner le produit avec la Sécurine étiquetée en N-terminal dans un vecteur Gateway :

Securin-Nt-F:

GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCGATCAGATTTTAAACAAGGAAA

Securin-Nt-R:

GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTTAAATAGAACATCAATGCCTTCCAA

Pour la construction contenant la Sécurine étiquetée en N-terminal, ces oligos ont été employés :

Securin-Ct-F:

GGGGACAAGTTTGTACAAAAAGCAGGCTTCATGGATCAGATTTTAAACAAGGAAA

Securin-Ct-R:

GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCAAATAGAACATCAATGCCTTCCAA

Après clonage dans le pDONR/Zeo et séquençage, chaque construction a été transférée dans soit le pUb>GFP::GAT ou le pUb>GAT::GFP afin d'obtenir les constructions Ub>GFP-Securin ou Ub>Securin-GFP. Les mouches transgéniques ont été ensuite générées par BestGene (BestGene Inc., USA). Comme la fusion Securin-GFP n'était pas stable/correctement repliée dans la cellule, nous avons travaillé sur la fusion GFP-Securin seule.

g) Western Blots

Les Western Blots ont été réalisés en gels d'acrylamide de 7,5% ou 10% en tampon Tris-Glycine. Les échantillons ont été préparés et les blots réalisés de la manière suivante :

Des mouches adultes ont été sélectionnées (2 femelles, 2 mâles) et placées dans un tube 1,5mL. Elles ont été immédiatement congelées dans l'azote liquide, et conservées dans l'azote jusqu'à sélection des mouches de tous les échantillons. Chaque tube a ensuite été retiré de l'azote liquide, et 100µL de tampon d'échantillon ajoutés (constitué de 100µL de 2x sample buffer (4% SDS, 20% glycérol, 10% 2-mercaptoéthanol, 0.004% bleu de bromophenol et 0.125 M Tris HCl, pH approx. 6,8, de Sigma Aldrich), 10µL de 80x Protease Inhibitor Cocktail (cOmplete, Roche, une tablette dans 2mL d'eau milliQ), et 1,2µL 100mM PMSF (Thermo Scientific)). Les mouches ont ensuite été broyées au broyeur électrique. Chaque tube a alors été

vortexé rapidement, et porté à ébullition à 150°C dans un bain sec dont les trous ont été remplis d'eau distillée, pendant 5min. Les tubes ont été conservés sur glace jusqu'à ce que tous aient été traités, et ont ensuite été centrifugés à 18000G pendant 1min avant chargement sur gel. Après électrophorèse à 20mA en tampon de migration (0,38M Glycine, 50mM Tris Base, 10mL de 10% m/v SDS dans de l'eau distillée), le transfert sur une membrane de nitrocellulose (Protran) a été réalisé à 500mA, 2h, 4°C en tampon de transfert (32mM Glycine, 93mM Tris Base, 3,43M éthanol dans de l'eau distillée). Le blocage de la membrane a été réalisé en TBS 1X (50 mM Tris-Cl, pH 7.5. 150 mM NaCl) + Tween 20 0,1% (v/v) + Lait 5% (TBST+Milk) pendant une heure. Les anticorps primaires ont été préparés en TBST+Milk en utilisant la dilution appropriée comme indiqué ci-dessous, et hybridés sur la nuit à 4°C. Après deux lavages brefs de la membrane en TBST puis quatre autres de dix minutes, les anticorps secondaires, préparés au 1:5000^{ème} également en TBST+Milk, ont été hybridés pendant deux heures à température ambiante. La révélation a été réalisée en ECL en utilisant les kits PICO et/ou DURA de Pierce.

Les anticorps primaires suivants ont été utilisés aux dilutions suivantes pour les Western Blots :

BubR1 (anticorps de souris obtenu auprès du laboratoire de D. Glover, 1:500^{ème}), α -Tubuline (anticorps de souris commandé auprès de Sigma Aldrich, 1:750^{ème}), GFP (anticorps de lapin obtenu auprès du laboratoire de D. McCusker, 1:1500^{ème}).

Les anticorps secondaires suivants ont été utilisés pour les Western Blots :

Anticorps de lapin anti-souris de chez Dako, et un anticorps de porc anti-lapin également de Dako. Tous deux sont fusionnés à la *horseradish peroxidase* (péroxydase initialement extraite du raifort) pour permettre leur révélation en ECL.

2) Matériels et méthodes complémentaires

a) **Tests de la létalité synthétique induite par une mutation en contexte d'induction de cassures double brin avec I-Cre**

Les tests de létalité ont été conduits de la façon suivante. Nous avons sélectionné des larves de troisième stade de drosophile porteuses de la mutation à tester à l'état homozygote, et du gène *I-CreI*, sous le contrôle d'un promoteur choc thermique, à l'état hétérozygote. Le nombre de larves a été noté, afin de pouvoir déterminer ensuite la létalité. Ces larves ont été isolées dans un tube de culture contenant un peu de nourriture à raison d'une vingtaine par tube (leur nombre exact a été noté pour pouvoir calculer la létalité) et soumis à un choc thermique par immersion jusqu'au bouchon dans un bain marie à 37°C pendant une heure. Les tubes ont ensuite été transférés à 25°C jusqu'à émergence des adultes, qui ont été recensés, et comparés au nombre de larves insérées pour chaque tube, de manière à obtenir un pourcentage de survie. Ce pourcentage de survie pour chaque tube est ensuite moyenné sur l'ensemble des tubes de chaque génotype pour obtenir la valeur finale.

Ces résultats sont ensuite comparés à deux contrôles : des larves uniquement porteuses homozygotes de la mutation à tester, et des larves uniquement porteuses du gène *I-CreI*.

Voici les génotypes testés :

Génotype	Abréviation
$y\ w; +; \frac{P\{v^+ hsp70>I-CreI\}\ sb}{+}$	I-CreI (1)
$w\ ligIV^{29}; +; +$	LigIV[29]
$w\ ligIV^{29}; +; \frac{P\{v^+ hsp70>I-CreI\}\ sb}{+}$	LigIV[29] I-CreI (1)
$w\ ligIV^{29}; +; \frac{P\{w^+ H2Az-GFP\}\ P\{v^+ hsp70>I-CreI\}\ sb}{+}$	LigIV[29] I-CreI (2)
$y\ w; +; \frac{P\{w^+ H2Az-GFP\}\ P\{v^+ hsp70>I-CreI\}\ sb}{+}$	I-CreI (2)
$\frac{w\ ligIV^5}{w\ ligIV^{29}; +; +}$	LigIV[5]/LigIV[29]
$\frac{w\ ligIV^5}{w\ ligIV^{29}; +; +} \frac{P\{w^+ H2Az-GFP\}\ P\{v^+ hsp70>I-CreI\}\ sb}{+}$	LigIV[5]/LigIV[29] I-CreI
$y\ w\ P\{v^+ hsp70>I-CreI\}; +; +$	I-CreI (3)
$w; +; mus309^{N1}$	Mus309[N1]
$y\ w\ P\{v^+ hsp70>I-CreI\}; +; mus309^{N1}$	Mus309[N1] I-CreI

$\frac{y w P\{v^+ hsp70>I-CreI\}}{y w}; +; +$	I-CreI (4)
$\frac{y w}{w}; +; \frac{mus309^{N1}}{Df(3R)Exel8154}$	Mus309[N1]/DfMus309
$\frac{y w P\{v^+ hsp70>I-CreI\}}{w}; +; \frac{mus309^{N1}}{Df(3R)Exel8154}$	Mus309[N1]/DfMus309 I-CreI
$y w; +; hus1^{37}$	Hus1[37]
$y w P[v^+ hsp70>I-CreI]; +; hus1^{37}$	Hus1[37] I-CreI

b) Génération des constructions BubR1 mutées dans le domaine KARD

Les mutants *BubR1*^{KARD} de drosophile ont été générés en se basant sur l'alignement de séquence publié dans Suijkerbuijk et al., 2012a, qui a permis de le localiser entre les acides aminés 679 et 696. Deux constructions ont été générées : un phosphomimétique, où les trois acides aminés aux positions homologues à celles phosphorylées dans le KARD de BubR1 humain, S685, S691 et T695, ont été remplacés par des acides aspartiques (D). Un mutant non-phosphorylable a également été généré, où ces trois positions ont été mutées en alanine (A). Pour cela, il a été utilisé une PCR en deux étapes. Une première étape où *BubR1* est amplifiée en deux morceaux : un du codon d'initiation au domaine KARD inclus, et l'autre du domaine KARD inclus au codon stop, en utilisant, pour les oligos sur les codons start et stop, des oligos contenant les séquences pour réaliser du clonage en méthode Gateway (Invitrogen, USA). Pour les oligos sur le domaine KARD, ils ont été choisis afin de pouvoir introduire les trois mutations désirées, en modifiant la séquence nucléotidique au minimum et de taille suffisante pour s'hybrider à une température d'hybridation correcte.

Les séquences d'oligos utilisées sont les suivantes :

F1: GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCGACTTTGACAATGCGAAAGAG

KARD-R(D):

GGTACCGCTCGTCGCCAAGCTTTGATCGCCGTGCTCATCGGTTTCCAATATGGTATCTAGTTG
CTTTCGCAAAGTTGGAGA

KARD-R(A):

GGTACCGCTCGTCGCCAAGCTTTGTGCGCCGTGCTCAGCGGTTTCCAATATGGTAGCTAGTTG
CTTTCGCAAAGTTGGAGA

KARD-F(D):

TCTCCAACCTTTGCGAAAGCAACTAGATACCATATTGGAAACCGATGAGCACGGCGATCAAAGC
TTGGCGACGAGCGGTACC

KARD-F(A):

TCTCCAACCTTTGCGAAAGCAACTAGCTACCATATTGGAAACCGCTGAGCACGGCGCACAAAGC
TTGGCGACGAGCGGTACC

R1:

GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCCTATTTCTGCAATATCGTGTTAACTT

A l'issue de cette étape, les produits de PCR ont été purifiés sur gel et inclus comme matrices d'une seconde PCR. Celle-ci se déroule tout d'abord en 10 cycles sans oligonucléotides, où les deux produits vont pouvoir s'hybrider par leur partie complémentaire (ici, le domaine KARD), et où un produit unique issu de cette hybridation va commencer à être produit, qui est similaire à une « religation » des deux parties de *BubR1* amplifiées. Ensuite, les oligonucléotides F1 et R1 s'hybrident à chaque extrémité de *BubR1* sont ajoutés, et vont permettre l'amplification de ce produit unique final. Ce produit a été purifié sur gel, puis a été, via le système gateway, transféré dans un vecteur de façon à le mettre en plusieurs étapes, sous le contrôle d'un promoteur Ubiquitine et l'étiqueter GFP en N-terminal. Ce vecteur, comprenant un P-element, a ensuite servi, après séquençage, à faire des lignées transgéniques de drosophile, par injection (Bestgene Inc, USA).

**c) Calcul de l'index mitotique sur les neuroblastes
issus de cerveaux de larves de troisième stade**

L'index mitotique est calculé comme étant le nombre de cellules en mitose par champ de microscopie. Afin de le déterminer précisément, un grand nombre de champs a été compté sur des préparations différentes. Les larves de troisième stade de *Drosophile* sont disséquées dans une solution de PBS 1X (0.01 M phosphate buffered saline (NaCl 0.138 M; KCl - 0.0027 M); pH 7.4, à 25°C), et leurs cerveaux

immédiatement transférés (pour tester par exemple l'effet d'une mutation qui aurait pour conséquence le maintien du SAC à l'état actif) dans une solution 1% Sodium Citrate pendant 5 minutes (qui est également réalisée après traitement colchicine), qui permet de réaliser un choc hypotonique et ainsi de condenser les chromosomes pour mieux les voir. Les cerveaux sont ensuite transférés 30 secondes dans une goutte d'acide acétique 45%, puis 15 secondes dans une goutte d'acide acétique 60%. Enfin, ils sont transférés dans une goutte d'acéto-orcéine sur une lamelle, et recouverts d'une lame. La préparation est ensuite écrasée entre deux feuilles de papier buvard tout d'abord en tapant sur la préparation avec un crayon à papier, puis ensuite en appuyant avec le pouce. Les lames sont ensuite scellées en utilisant de l'acéto-orcéine additionnée de sorbitol, puis conservées à 4°C en attendant leur visualisation au microscope en contraste de phase.

Une variante de ce protocole a également été utilisée, qui consiste à incuber les cerveaux après dissection dans une solution PBS 1X + Colchicine 40µM pendant 30 minutes. Ce traitement permet de bloquer la cellule en métaphase si le SAC est fonctionnel (la colchicine étant une drogue qui va dépolymériser les microtubules des cellules et ainsi activer le SAC), montrer de cette manière, si l'on observe pas ce blocage, que le SAC a été inactivé. Ce protocole est adapté de *Drosophila Protocols* (ed. Sullivan et al.). CSHL Press, Cold Spring Harbor, NY, USA, 2000.

Lors de la visualisation au microscope, le nombre de métaphases et d'anaphase sont rapportés au nombre de champs explorés par lame, donnant l'index mitotique, le pourcentage d'anaphase étant le rapport Anaphases / (Métaphases + Anaphases).

Ce protocole a été réalisé sur des larves des génotypes suivants :

Génotype
$y\ w; +; +$
$y\ w; \frac{bubR1^I}{CyO, y^+}; +$

$y w; \frac{bubR1^1}{CyO, y^+}; P\{w^+ Ub>GFP-BubR1^{KARD \rightarrow D}\}$
$y w; \frac{bubR1^1}{CyO, y^+}; P\{w^+ Ub>GFP-BubR1^{KARD \rightarrow A}\}$
$y w; bubR1^1; P\{w^+ Ub>GFP-BubR1^{KARD \rightarrow D}\}$
$y w; +; P\{w^+ Ub>GFP-BubR1^{KARD \rightarrow D}\} Mad2^p$

L'allèle *Mad2^p* utilisé ici a déjà été publié (Buffin et al., 2005), et l'allèle *BubR1¹*, nul, est décrit dans Basu et al., 1999; Logarinho et al., 2004.

d) Génération d'une construction BubR1 étiquetée Dendra2 sous contrôle du promoteur endogène

Afin de pouvoir étudier la dynamique de BubR1 sur le tether, une construction *BubR1* sous promoteur endogène et étiquetée *Dendra2* a été créée. La raison de l'utilisation d'un promoteur endogène est de pouvoir conserver au plus possible une régulation proche de ce qui est observé chez le sauvage, et celle de l'étiquette *Dendra2* est d'avoir une étiquette photoconvertible, pour pouvoir étudier la dynamique de BubR1, et en particulier différencier des pools de BubR1 spécifiques dans la cellule.

Pour faire un tel vecteur, un plasmide générique de sous-clonage a été utilisé, pBluescript KS (Stratagene, USA), dans lequel la construction a été assemblée, qui a ensuite été clonée dans le plasmide final.

La stratégie a ainsi commencé par une amplification par PCR du promoteur de BubR1 et de son 5'UTR, depuis un plasmide disponible au laboratoire (pCasper *bubR1>GFP-BubR1*, donné par Roger Karess, (Buffin et al., 2005)). Pour ce faire, il a été employé les oligonucléotides BubR1prom5'UTR-F et BubR1prom5'UTR-R, qui contiennent les sites de restriction BamHI et SpeI, et HindIII respectivement. Cet insert a ainsi été cloné par restriction/ligation BamHI-HindIII dans le pBluescript KS.

BUBR1PROM5'UTR-F:

ACATGAGGATCCTGACATACTAGTGGTACCGATATCgcacgaggtaga

BUBR1PROM5'UTR-R:

ACATGAAAGCTTACGCGTatcggtctcctcaagcaa

Une démarche similaire a ensuite été utilisée pour amplifier par PCR l'étiquette photoconvertible *Dendra2*, depuis un plasmide commercial la contenant (pDendra2 vector, cat #632544, Clontech, USA). Les oligos Dendra2-F et Dendra2-R ont été utilisés, introduisant les sites de restriction flanquants HindIII, et AgeI et XhoI respectivement. Ceci afin d'insérer l'amplifiat dans le pBluescript KS précédemment obtenu par une opération de restriction/ligation HindIII-XhoI. Ainsi, cette étiquette a été mise à la suite de l'ensemble promoteur *BubR1*-5'UTR dans le vecteur. Cet ensemble a ensuite été cloné dans un vecteur modifié à partir d'un autre déjà disponible au laboratoire, basé sur le pCaSpeR 4. Ce vecteur contenait une étiquette *GFP*, suivie d'une cassette pour cloner par méthode dans le même cadre de lecture une séquence codante Gateway (convertissant ainsi le vecteur en vecteur de destination, Invitrogen, USA), elle même suivie d'un terminateur SV40. Cette étiquette *GFP* étant clonée entre AgeI et SpeI, une restriction/ligation avec l'insert issu du pBluescript KS précédemment obtenu nous a permis d'enlever l'étiquette *GFP* tout en la remplaçant par la construction *BubR1* promoteur-5'UTR *BubR1-Dendra2*. Une réaction Gateway de type LR a ensuite été réalisée pour insérer la séquence codante de *BubR1* à la place de la cassette Gateway, en utilisant un des vecteurs d'entrée précédemment obtenus lors de la génération des constructions *BubR1*. Ceci a ainsi permis la génération d'un vecteur pCaSpER4-*BubR1*promoteur-5'UTR*BubR1-Dendra2-BubR1*. Ce vecteur a été ensuite vérifié par séquençage puis utilisé pour faire de la transgénèse et faire générer des stocks de mouches portant le transgène *Dendra2-BubR1* sous le contrôle de son promoteur endogène et de ses régions régulatrices 5'UTR (Bestgene Inc, USA).

e) Étude de la ségrégation des chromosomes acentriques et de la dynamique de localisation de constructions dans différents mutants

Des larves femelles drosophile de troisième stade ont été sélectionnées, puis soumises le cas échéant (HS) à un choc thermique à 37°C d'une heure afin d'induire l'expression de I-CreI, pour générer des cassures double brin dans le génome (suivi d'une période de repos de 1h30 à température ambiante, pour que le cycle cellulaire redémarre).

Pour l'étude de la ségrégation des chromosomes acentriques dans des mutants *BubR1*, ces larves ont été choisies des génotypes suivants, tous en fond *BubR1* nul, à l'exception des contrôles WT :

Génotype	Abréviation utilisée
$y\ w; +; \frac{P\{w^+ H2Az-GFP\} P\{v^+ hsp70>I-Crel\} sb}{+}$	WT
$y\ w; bubR1^1; \frac{P\{w^+ Ub>GFP-BubR1^{KARD \rightarrow D}\}}{P\{w^+ H2Av-mRFP\} P\{v^+ hsp70>I-Crel\}}$	KARD->D
$y\ w; bubR1^1; \frac{P\{w^+ mRFP-BubR1^{KAN}\}}{P\{w^+ H2Az-GFP\} P\{v^+ hsp70>I-Crel\} sb}$	KAN
$y\ w; bubR1^1; \frac{P\{w^+ mRFP-BubR1^{KENKAN}\}}{P\{w^+ H2Az-GFP\} P\{v^+ hsp70>I-Crel\} sb}$	KENKAN
$y\ w; bubR1^1; \frac{P\{w^+ mRFP-BubR1^{KENKANKD}\}}{P\{w^+ H2Az-GFP\} P\{v^+ hsp70>I-Crel\} sb}$	KENKANKD

Les mutants KEN et KAN (ainsi que KENKAN) sont des substitutions des trois acides aminés de chaque motif par des alanines et le mutant KD est un mutant *Kinase Dead* (K1204A). Ces mutants nous ont été gracieusement donnés par Zohra Rahmani (partiellement publiés dans Rahmani et al., 2009). Le mutant *BubR1*^{KARD→D} est un mutant du domaine KARD décrit dans le paragraphe b).

Pour l'étude de la ségrégation des chromosomes acentriques dans un mutant *Bub3* nul, le protocole général est le même pour la génération des cassures et la sélection des larves. Les génotypes suivants ont été étudiés :

Génotype	Abréviation utilisée
$\frac{y\ w\ P\{v^+ hsp70>I-Crel\}}{y\ w}; +; +$	WT
$\frac{y\ w\ P\{v^+ hsp70>I-Crel\}}{y\ w}; \frac{P\{w^+ H2Az-mRFP\}}{+}; Bub3^1$	Bub3[1] I-Crel

$y w; \frac{P\{w^+ H2Az-mRFP\}}{+}; Bub3^1$	Bub3[1]
---	---------

Enfin, pour l'étude de la dynamique de localisation de la construction *GFP-Fzy* dans des mutants *BubR1*, les génotypes suivants ont été observés :

Génotype	Abréviation utilisée
$y w; \frac{P\{w^+ GFP-Fzy\}}{+}; \frac{P\{w^+ H2Az-mRFP\} P\{v^+ hsp70>I-CreI\}}{+}$	WT
$y w; \frac{P\{w^+ GFP-Fzy\} BubR1^1}{BubR1^1}; \frac{P\{w^+ H2Az-mRFP\} P\{v^+ hsp70>I-CreI\}}{P\{w^+ mRFP-BubR1^{KD}\}}$	KD
$y w; \frac{P\{w^+ GFP-Fzy\} BubR1^1}{BubR1^1}; \frac{P\{w^+ H2Az-mRFP\} P\{v^+ hsp70>I-CreI\}}{P\{w^+ mRFP-BubR1^{KAN}\}}$	KAN

Ces larves ont ensuite été disséquées en PBS 1x (0.01 M phosphate buffered saline (NaCl 0.138 M; KCl - 0.0027 M); pH 7.4, à 25°C), et leurs cerveaux prélevés et placés entre lame et lamelle dans une goutte de PBS 1x. La préparation a été scellée avec de l'huile halocarbon 700 (Sigma Aldrich). La visualisation a été faite dans les 30 minutes après dissection avec une camera emCCD sur un microscope Zeiss équipé d'un équipement spinning disk (Yokogawa, Japan). Des films en timelapse ont été faits en utilisant un objectif à immersion 100x 1.4 apochromatique, avec une image par 20 secondes. La localisation de la protéine étiquetée GFP ou RFP (dans le cas des mutants *Fzy* et *BubR1* respectivement), la ségrégation des chromosomes acentriques, ainsi que le temps écoulé entre la survenue de l'anaphase et la ségrégation du dernier acentrique ont été suivis. Les divisions cellulaires ont ensuite été classées en différentes catégories : euploïde (lorsque les chromosomes se séparent en deux pools identiques) ou aneuploïde (lorsque une anomalie de ségrégation des chromosomes a lieu) pour le type de ségrégation et localisation ou absence de localisation pour étudier la dynamique des constructions fluorescentes. Les vitesses de ségrégation du dernier acentrique ont également été relevées pour compléter le profil constitué à partir de ces mutants.

Résultats

1) Résultats de l'article 1

a) Résumé de l'article

La transmission correcte du génome requiert l'attachement correct des chromosomes aux microtubules du fuseau mitotique par l'ensemble centromères/kinétochores. Nous avons identifié récemment un mécanisme permettant la ségrégation correcte des chromatides acentriques cassées, impliquant un lien d'ADN (le « tether ») qui relie les fragments cassés acentriques et centriques. BubR1, un élément du point de contrôle de l'assemblage du fuseau mitotique (SAC), s'accumule sur le tether et facilite la ségrégation correcte des chromatides cassées. Cependant, la régulation et la fonction de BubR1 au tether restaient inconnues. Ici, nous montrons que le domaine de liaison à Bub3 (Bub3-BD) est requis pour la localisation de BubR1 sur le tether. En effet, Bub3 s'associe avec le tether et médie le recrutement de BubR1 au tether ainsi que la ségrégation correcte des chromatides cassées. De plus, Cdc20, une sous-unité clé de l'APC/C, une E3 ubiquitine ligase qui induit l'anaphase, s'associe avec le tether de manière dépendante de la KEN box de BubR1, ce qui suggère que Bub3/BubR1 séquestre Cdc20 sur le tether inhibant ainsi localement l'APC/C. En effet, un biosenseur pour l'activité de l'APC/C montre une inhibition locale de l'APC/C dépendante de BubR1 sur le tether pendant l'anaphase précoce. Nous proposons que Bub3 recrute BubR1 aux chromosomes cassés, qui, ensuite, inhibe l'APC/C localement en séquestrant Cdc20, préservant ainsi l'intégrité du tether et permettant la ségrégation correcte des chromatides cassées.

Bub3-associated BubR1 promotes local inhibition of the APC/C at DNA breaks by sequestering Fizzy/Cdc20 during anaphase

Authors

Derive, N. ^{1,2} ; Landmann, C. ^{1,2} ; Montembault, E. ^{1,2} ; Claverie, M.C. ^{1,2} ; Founounou, N. ^{1,2} ; Goutte-Gattat, D. ^{1,2} ; McCusker, D. ^{1,2} ; Royou, A. ^{1,2*}

Affiliation

¹ *Université de Bordeaux, IECB/IBGC, UMR 5095, 2 rue Robert Escarpit, 33607 Pessac, France*

² *CNRS, IECB/IBGC, UMR 5095, 2 rue Robert Escarpit, 33607 Pessac, France*

* Corresponding author

a.royou@iecb.u-bordeaux.fr

Keywords: Mitosis, DNA damage, BubR1, Bub3, Checkpoint, Chromosomes, anaphase

Running Title: BubR1 sequesters Cdc20 on broken chromosomes

Summary

Correct transmission of the genome requires proper chromosome attachment to spindle microtubules via the centromere/kinetochore. Recently, we identified a mechanism by which acentric chromatids segregate properly, involving a DNA tether that links acentric and centric fragments. BubR1, a component of the spindle assembly checkpoint, accumulates on the tether and facilitates proper segregation of broken chromatids. However, the regulation and function of BubR1 on the tether remain unknown. Here, we show that the Bub3-Binding Domain of BubR1 is required for its localization on the tether. Consistently, Bub3 associated with the tether and mediated BubR1 recruitment to the tether as well as proper broken chromatid segregation. Moreover, Cdc20, a key subunit of the Anaphase-Promoting-Complex/Cyclosome (APC/C), an E3 ubiquitin ligase that triggers anaphase, associated with the tether in a BubR1 KEN box-dependent manner, suggesting that Bub3/BubR1 sequester Cdc20 on the tether thereby inhibiting the APC/C locally. Consistently, a biosensor for APC/C activity showed a BubR1-dependent local inhibition of APC/C on the tether during early anaphase. We propose that Bub3 recruits BubR1 to broken chromosomes, which, in turn, inhibits the APC/C locally by sequestering Cdc20, thereby preserving tether integrity and promoting proper segregation of broken chromatids.

Introduction

DNA Double strand breaks (DSBs) are particularly harmful to cells as they produce fragments of chromosomes lacking the centromere/kinetochore. In interphase, the presence of DSBs triggers a conserved DNA damage response (DDR) that promotes DNA repair and delays mitotic entry via activation of the DNA damage checkpoint ¹. Less is known about how mitotic cells process DSBs. However, given the high frequency of cell division in most developing organisms and in adult humans, the occurrence of DSBs in mitosis is likely to be significant. Indeed, work in various model organisms has shown that DSBs in mitosis delay anaphase onset via the activation of the DNA damage or/and spindle assembly checkpoints depending on the extent of damage ²⁻⁴. Moreover, recent studies in vertebrate mitotic cells found that the presence of DSBs activates the initial steps of the DDR, which “mark” the breaks, followed by an inhibition of the downstream pathways that repair the damage either by Non Homologous End Joining (NHEJ) or Homologous Recombination (HR) ⁵⁻⁸. These studies further show that a full DDR is reactivated upon G1 entry ^{5, 6}. Thus, DSBs are detected in mitosis and marked to facilitate their repair after mitotic exit. However, it remains unclear how the cell segregates the two broken chromosome fragments; the centric and acentric fragments resulting from DSB generation. In yeast, chromosome fragments with DSBs remain apposed throughout mitosis ². In *Drosophila*, the centric and acentric fragments generated by the endonuclease I-Crel, which creates DSBs at rDNA repeats, remained attached via a DNA thread that we refer to as a “tether” ⁹. These tethers maintain apposition of the fragments during prometaphase, facilitating the proper poleward movement of the broken sister chromatids during anaphase. The kinases BubR1, Polo and Aurora B accumulate on these tethers throughout mitosis. Attenuation of BubR1 or Polo function provoked severe defects in broken chromatid segregation and induced synthetic lethality in combination with I-Crel expression. It was therefore proposed that BubR1 and Polo act to facilitate the proper segregation of broken chromatids by maintaining

the integrity of the tether, providing an opportunity to repair the damage in the next cell cycle.

BubR1 localizes to unattached kinetochores and plays a conserved role in the spindle assembly checkpoint (SAC) that delays anaphase onset until all chromosomes are properly attached to the spindle microtubules ¹⁰. Anaphase onset is triggered by the APC/C, which targets Securin and Cyclin B for proteolysis, thereby allowing sister chromatid separation due to separase-mediated cleavage of the cohesin complex and mitotic exit via dephosphorylation of Cyclin B/CDK1 substrates. In the presence of unattached kinetochores, BubR1, Bub3 and Mad2 form the mitotic checkpoint complex (MCC) that sequesters Cdc20, a key subunit of the APC/C, thereby inhibiting its activity globally ¹¹. BubR1 also plays a role in promoting the stabilization of kinetochore/microtubules attachment ^{10, 12, 13}. We recently identified a novel localization and function for BubR1 on DSBs ⁹. However, the mechanisms that promote BubR1 localization on broken chromatids and its molecular function in facilitating their proper segregation are yet to be elucidated.

Results

The Bub3-Binding domain of BubR1 is necessary and sufficient for BubR1 localization on the kinetochore and tether

Drosophila BubR1 contains four large domains separated by unstructured regions. The N terminal domain is well conserved and contains a KEN box (Lysine-Glutamate-Asparagine) and tetratricopeptide repeats required for BubR1 sequestration of Cdc20 (Fizzy in *Drosophila*) and its spindle checkpoint activity¹³⁻¹⁶. The second domain, called the Bub3-binding domain (Bub3-BD or GLEBS domain), is conserved and promotes BubR1 recruitment to the kinetochore via its interaction with Bub3 in yeast and vertebrates¹⁷⁻¹⁹. This domain also contains a Kinetochore-Associated-Regulatory-Domain (KARD) identified in vertebrate BubR1, whose phosphorylation promotes BubR1 association with PP2A-B56 α at the kinetochore^{20, 21}. Using a secondary structural prediction algorithm we identified a third structured domain with poor conservation. Finally, the C terminus contains the kinase domain, which is known to play a role in stabilizing kinetochore-microtubule attachment¹³.

To determine which domain of BubR1 is required for its localization on the tether, the DNA thread that links the centric and acentric chromosome fragments, we cloned a series of truncated BubR1 constructs tagged at their N terminus with GFP and under the control of an ubiquitous promoter. We cloned eleven BubR1 constructs shown schematically in Figure 1A. The expression of the GFP::BubR1 fusion proteins in adult flies was confirmed by western blotting (Figure 1B). The full-length fusion rescued the lethality of the *bubR1*¹ null mutant.

The truncated GFP::BubR1 constructs and H2A::mRFP, a marker of chromosomes, were imaged by time-lapse spinning disk fluorescent microscopy in third instar larvae neuroblasts expressing I-Cre1 under the control of the heat shock 70 promoter. I-Cre1 creates DSBs specifically at one location in the X and Y chromosomes, generating two distinct fragments, a short fragment containing

the centromere and a long acentric fragment^{9, 22}. Late third instar larvae were heat shocked at 37°C for one hour and allowed to recover for at least one hour and half at room temperature. We then dissected the central nervous system and monitored the dynamics of the BubR1 fusions in dividing neuroblasts. As expected, full length GFP::BubR1 signal accumulated on kinetochores at prometaphase and faded during anaphase (Figure S1). Moreover, as previously observed with a different GFP::BubR1 transgene and with anti-BubR1 antibodies⁹, the fluorescent signal remained on the tether of the lagging I-CreI-induced broken chromatids throughout anaphase (Figure S1)⁹. The localization of the truncated BubR1 fusions on the kinetochore and tether are summarized in Figure 1A. We found that amino acids 330-762, containing the Bub3-binding domain, were necessary and sufficient for BubR1 localization on both the kinetochore and the tether (Figure 1A and C, S1, Video 1).

Glutamate 481 in the Bub3-Binding Domain is required for BubR1 recruitment on the kinetochore and the tether

Glutamate 406 in the Bub3-BD of human BubR1 has been identified as a key residue for BubR1 interaction with Bub3²³. This conserved residue corresponds to glutamate 481 in the Drosophila BubR1 sequence. To determine if the BubR1 interaction with Bub3 is required for BubR1 localization on the tether, we mutated glutamate 481 to lysine in the Bub3-BD construct (330-762 [E481K]) and monitored its dynamics during mitosis (Figure 1A). We found that 330-762 [E481K] is expressed in the adult fly (Figure 1B), but localized neither to the kinetochore nor the tether in mitotic cells (Figure 1C, Video 2). These data confirmed that E481 is a key conserved residue essential for BubR1 localization on the kinetochore and support the idea that Bub3 mediates BubR1 localization on the kinetochore and tether.

Bub3, but not proteins of the KMN network, nor the spindle assembly checkpoint components Mad1 or Mps1, localize to the tether during mitosis

Bub3 interacts with BubR1 at the kinetochore^{18, 24}. To assess the role of Bub3 in mitotic cells with broken chromosomes, we investigated the dynamics of Bub3 in dividing neuroblasts after I-Crel expression. We generated transgenic flies expressing RFP::Bub3 under the control of the Bub3 promoter. The fusion protein rescued the lethality associated with the *bub3*¹ mutant allele²⁵, consistent with it being functional. We found that RFP::Bub3 localized on the kinetochore during prometaphase and disappeared from the kinetochore progressively during anaphase, in agreement with previous findings using anti-Bub3 antibodies²⁶ (Figure 2A). However, in I-Crel expressing cells, RFP::Bub3 signal lingered on the lagging broken chromatids throughout anaphase. Like BubR1, the signal disappeared at telophase (Figure 2A, Video 3). Similar results were obtained using a GFP::Bub3 construct (data not shown). Moreover, the localization of RFP::Bub3, GFP::Bub3 and GFP::BubR1 on breaks was evident after ablation of a single chromosome with a 355nm pulsed-laser during mitosis (Figure 2D and E, video 6 and 7).

It was recently shown that human Spc105/Spc7/KNL1/Blinkin, a component of the core kinetochore KNL1/Mis12 complex/Ndc80 (KMN) network, interacts directly with BubR1 and controls the localization of BubR1 and Bub3 to the kinetochore²⁷⁻³⁰. Although Spc105 is dispensable for BubR1 recruitment to the kinetochore in *Drosophila*³¹, we tested the idea that it might promote BubR1 and Bub3 association with the tether. Thus, we first monitored the dynamics of GFP::Spc105 in mitotic cells with broken chromosomes. GFP::Spc105 localized to the kinetochore until late telophase (Figure S2A)³¹. However, no signal was detected near the lagging broken chromatids, suggesting that Spc105 is not part of the upstream pathway that recruits BubR1 and Bub3 to the tether (Figure S2A).

Next, we assessed the dynamics of several other components of the KMN network, including Nuf2-GFP, GFP::Spc25, GFP::Mis12 and GFP::CenpC in mitotic cells with DSBs. We found that they exclusively localized to the kinetochore throughout mitosis (Figure S2B, C and data not shown)³². These

results indicate that the tether does not serve as a platform for the assembly of a neo-kinetochore. Consistent with this idea, Cid, the H3 histone variant that specifically associates with centromeric DNA and is essential for Kinetochore assembly and function, does not localize on the tether⁹.

We pursued our hunt for upstream components controlling Bub3 and BubR1 recruitment on the tether by testing the localization of other proteins known to be involved in the Bub3/BubR1-dependent SAC response. We first monitored the localization of GFP::Mad1 on broken chromosomes. Mad1 has a conserved SAC function on the kinetochore. It recruits Mad2, which exists in two conformations: an open (O-Mad2) and closed (C-Mad2) conformation. The complex Mad1/C-Mad2 promotes O-Mad2 to C-Mad2 conversion. C-Mad2 then binds Cdc20, BubR1 and Bub3, forming the MCC, a diffusible APC/C inhibitory complex¹¹. We found that GFP::Mad1 accumulated on the kinetochore during prometaphase and disappeared from the kinetochore at anaphase onset (Figure S2D)³³. In agreement with our previous findings with GFP::Mad2⁹, no signal was detected near the lagging broken chromatids during anaphase (Figure S2D). Consistently, BubR1 localization on the tether did not depend on Mad1 (Figure S2E). These data, and the fact that *mad2* mutants are not sensitive to I-Crel expression, collectively confirm our model that the Mad1/Mad2 pathway does not play a role in the proper segregation of broken chromatids⁹.

Next, we analyzed the dynamics of Mps1 on broken chromosomes. Mps1 functions in the SAC response by recruiting Bub3 and BubR1 to the kinetochore^{34, 35}. We found that the GFP::Mps1³⁶ signal was low, but nevertheless visible on the kinetochore, however, no signal was detected near the lagging broken chromatids during anaphase (Figure S2F). The observation that GFP::BubR1 is recruited on laser-induced breaks in the *mps1[1]* mutant³⁷, confirmed that Mps1 does not mediate BubR1 localization on broken chromatids (Figure S2G).

Bub3 and BubR1 depend on each other for their localization on the kinetochore and tether

Next, we tested the dependency relationship between BubR1 and Bub3 for their localization to the tether. First, we analyzed the localization of RFP::Bub3 in *bubR1*¹ null mutant neuroblasts after I-Crel expression. RFP::Bub3 signal was not detected on the kinetochore in any of the *bubR1* mutant cells monitored, consistent with immunostaining data using anti-Bub3 antibodies ²⁶. In addition, we found no accumulation of RFP::Bub3 near the broken chromatids during anaphase, indicating that Bub3 requires BubR1 to accumulate on the tether (Figure 2B, Video 4). Next, we monitored the dynamics of GFP::BubR1 in a *bub3*¹ mutant. The *bub3*¹ allele carries a point mutation in the coding region, resulting in lethality at the pupal stage ²⁵. In 46% *bub3*¹ mutant cells, the Bub3 mutant protein failed to localize to the kinetochore ²⁵. Consistently, GFP::BubR1 did not localize on the kinetochore in 56% *bub3*¹ mutant cells. In addition, in the majority of *bub3*¹ mutant cells, GFP::BubR1 failed to localize on the tether (n=9)(Figure 2C, Video 5). Collectively, these results indicate that co-association of BubR1 and Bub3 is required for their robust localization at the kinetochore and tether.

BubR1 and Bub3 are required for proper segregation of broken chromatids

We next investigated the role of BubR1 and Bub3 in the mechanism that allows the proper segregation of broken chromatids. To do so, we analyzed the segregation of broken chromatid fragments in live neuroblasts expressing H2Az::RFP. We quantified the frequency of cell division where the broken chromatids segregate equally to each pole, giving rise to two daughter cells with proper genome content (euploid cells). When broken chromatids failed to partition equally, two daughter cells with incorrect genome content were produced. We also monitored the rate at which the last broken chromatid moved poleward. In agreement with our previous observations ⁹, the I-Crel–induced broken fragments segregated equally within 4 minutes after anaphase onset in the majority of wild type cells, thus producing euploid daughter cells in 78% of cell divisions (n=98) (Figure 3B). Next, we analyzed the segregation of

damaged chromatids in *bub3*¹ and *bubR1*¹ mutants. Given that *bub3*¹ and *bubR1*¹ mutant cells alone exhibit a high frequency of anaphase with lagging chromosomes^{25, 38, 39}, cells in which no clear lagging broken X chromatids could be followed due to extensive chromosome segregation defects were excluded from our analysis. In *bub3*¹ and *bubR1*¹ mutants, the frequency of equal segregation of broken chromatids was dramatically reduced (38% and 27% respectively vs 78% for WT)(Figure 3A and B), implying that Bub3, like BubR1, facilitates the faithful segregation of broken chromatids. In addition, the majority of broken chromatids showed a reduced rate of poleward movement (Figure 3C). These defects were associated with an elevated occurrence of broken chromatids forming micronuclei at the end of mitosis (Figure 3D).

To further define the function of BubR1 in this mechanism, we analyzed two *bubR1* mutant alleles that lack specific functions during mitosis. The *bubR1-KEN* mutant has two point mutations in the first KEN box in which lysine 7 and glutamate 8 are mutated into alanine. These mutants specifically impair BubR1 spindle assembly checkpoint function¹³. The *bubR1-KD* has a point mutation in its kinase domain that abolishes its kinase activity. This mutant retains an intact checkpoint but exhibits mild defects in kinetochore/microtubule attachment¹³. Previously, we found that the KEN or KD mutations did not impair BubR1 recruitment to the tether⁹. When we analyzed the dynamics of broken chromatids in these mutants, we found that both *bubR1-KEN* and *bubR1-KD* mutants had significant defects in broken chromatid segregation compared to wild type cells. Interestingly, these defects were substantially more severe in the *bubR1-KEN* than the *bubR1-KD* mutant⁹. Since one copy of these transgenes was expressed in the *bubR1*¹ null background, two hypotheses may explain these results. First, although the expression of one copy of the *bubR1-KEN* and *bubR1-KD* transgene was sufficient to rescue the lethality of the *bubR1* null allele, it may not have been sufficient to support the segregation of broken chromatids. Alternatively, the severe broken chromatid segregation defects in *bubR1-KEN* may reflect a specific role for the KEN motif in the mechanism that facilitates the proper poleward movement of the broken fragments. To

distinguish between these possibilities, we analyzed the segregation of broken chromatids in *bubR1-KEN(2X)* and *bubR1-KD(2X)* mutants in which each transgene is expressed in two copies. We found that the frequency of cells that fail to properly segregate the broken fragments increased slightly but significantly in *bubR1-KD(2X)* mutant compared with wild type (42% vs 22%). This frequency was dramatically higher in *bubR1-KEN(2X)* (60%). These rates are similar to that observed for one copy of each transgene ⁹. These data suggests that both the KEN motif and kinase activity act to facilitate the proper segregation of broken fragments; however, the KEN motif seems to play a more prominent role in this process. This is supported by our finding that a large number of *bubR1-KEN(2X)* mutant cells exhibited slow or no poleward movement of broken fragments (Figure 3C). This phenotype was associated with an increase in the frequency of daughter cells with micronuclei. Our findings that the expression of two copies of *bubR1-KEN* exhibited similar defects in broken fragment segregation as the expression of one copy, indicates that the KEN box plays a significant role in facilitating the faithful segregation of chromosome fragments.

Fizzy (Cdc20) is recruited on the tether in a BubR1 KEN box dependent manner

Given that the KEN box is required for BubR1 association with Fizzy (Fzy) ¹³, we tested the hypothesis that BubR1 functions on the tether to sequester Fzy throughout mitosis. To do so, we first monitored the dynamics of GFP::Fzy in wild type cells expressing I-CreI. GFP::Fzy accumulated on the kinetochore during prometaphase and disappeared progressively from the kinetochores during anaphase (Figure 4A, video 8) ^{31, 32, 40}. Interestingly, we found that the GFP::Fzy signal lingered on the tether in the majority of cells during anaphase (Figure 4A and C, video 8). The frequency of *bubR1-KD* mutant cells with GFP::Fzy signal on the tether was slightly lower (Figure 4A and C). In contrast, a majority of *bubR1-KEN* mutant cells failed to localize GFP::Fzy on the tether (Figure 4A and C, video 10). Finally, no GFP::Fzy was detected on the tether in 8 out of 9 *bubR1¹* mutant cells (Figure 4A and C). Similar results were observed

after laser-induced chromosome breaks (Figure 4B and D). GFP::Fzy accumulated on breaks in all wild type and a large proportion of *bubR1-KD* mutant cells (Figure 4B and D, Video 11).. In contrast, GFP::Fzy accumulated on laser-induced breaks in only 20% of *bubR1-KEN* cells (Figure 4B and D, Video 12).

This result indicates that Fzy is retained on breaks/tethers during anaphase partly via its association with the BubR1 KEN motif. This raises the possibility that the BubR1-mediated sequestration of Fzy locally inhibits the APC/C on the tether and this inhibition is required to maintain the integrity of the tether by preventing the degradation of key APC/C substrates even during anaphase. One indirect target of the APC/C is the Cohesin complex. Cohesin is a tripartite complex formed of a pair of SMC proteins, SMC1 and SMC3 and a kleisin protein, Scc1/Rad21 (REF). The complex serves to hold sister chromatids together. Upon APC/C activation, the ubiquitylation and subsequent proteolysis of Securin releases the Separase that cleaves the Cohesin complex and permits the separation of sister chromatids. Cohesin is involved in the pathway that repairs DSBs by homologous recombination during interphase ⁴¹. We therefore tested the idea that Cohesin might be involved in the BubR1-dependent pathway that facilitates the segregation of broken chromatids. To do so, we analyzed the dynamics of GFP::Rad21 during mitosis with broken chromosomes. GFP::Rad21 signal localized to the inner-kinetochore and chromatids during prometaphase. At anaphase onset, within 20 seconds, the signal abruptly disappeared from the chromosomes and no signal was detected on the lagging fragments in 100% of cells (n=18) (Figure S3). To pursue this analysis and identify the APC/C substrate that might be protected from destruction on the tether, we monitored the localization of Securin and Cyclin B, two established APC/C substrates. We tagged Securin with GFP on its N or C terminus and analyzed its dynamics in mitotic cells with broken chromosomes. GFP::Securin and Securin::GFP were uniformly cytoplasmic during prometaphase (Figure S3 and data not shown). The signal disappeared gradually and globally during anaphase, likely due to its degradation by the

proteasome. As reported previously, GFP::Cyclin B localized on the kinetochore, spindle and centrosome during prometaphase and disappeared progressively during anaphase (Figure S3)⁴². Both GFP::Cyclin B and GFP::Securin did not localize specifically on the tether during anaphase. It therefore seems unlikely that they play a direct role in regulating the faithful segregation of broken chromosomes (Figure S3).

BubR1 induces local APC/C inhibition on the tether during early anaphase

To determine if BubR1 localization on the tether induces local APC/C inhibition, we created a synthetic APC/C substrate that associated with the tether. We fused the first 246 amino acids of Cyclin B, which contains the Dead Box, the recognition motif for Fzy, and the lysines that are ubiquitylated by the APC/C with full-length Bub3. GFP was fused on the N terminus of the probe to follow the disappearance of the fluorescence overtime (Figure 5A). We then measured the relative fluorescence intensity disappearance of the synthetic probe, called GFP::CycBNt::Bub3, on the kinetochore and tether specifically, from metaphase to late anaphase in wild type, *bubR1-KEN* and *bubR1* null mutants after I-Crel expression (see material and methods)(Figure 5B and C, Vidéo 12 and 13). If tether-associated BubR1 inhibits the APC/C locally via the sequestration of Fzy, we expect to detect a *bubR1-KEN* box-dependent delay of GFP::CycBNt::Bub3 degradation on the tether during anaphase. To quantify the kinetics of GFP-CycBNt-Bub3 disappearance, a sigmoid curve was fit to the data points and the efficiency of GFP::CycBNt::Bub3 degradation deduced from the hillslope (h) (Figure 5C). This analysis revealed that, in control cells, GFP::CycBNt::Bub3 disappeared from the tether at a two-fold slower rate than in *bubR1-KEN* mutant cells ($h=0.49\pm0.16$ vs $h=1.35\pm0.19$ respectively, $p<0.0001$). The signal disappeared completely from the tether on average 3 minutes after anaphase onset in control cells compared with 1 minute in *bubR1-KEN* mutant cells (Figure 5D). Finally, no GFP::CycBNt::Bub3 was detected on the kinetochore and tether in cells depleted of BubR1 (Figure 5B and D). These results indicate that the presence of BubR1 on the tether is sufficient to protect APC/C substrates from degradation.

Discussion

In this work, we showed that BubR1 depends on its association with Bub3 to localize on I-Crel and laser-induced tethers, where it promotes the correct segregation of broken chromatids. Moreover, we found that one function of the BubR1/Bub3 complex on the tether is to sequester Fzy, thereby inhibiting the APC/C locally during anaphase (Figure 5E).

The upstream component that recruits Bub3/BubR1 on the tether has yet to be identified. In yeast and mammals, the interaction of BubR1 and Bub3 with Knl1/Spc105/Spc7/Blinkin plays an important role in their recruitment to the kinetochore²⁷⁻³⁰. However, recent structural studies on human BubR1 reveal that mutations in the TPR motif prevent its association with Knl1/Spc105/Spc7/Blinkin do not affect its kinetochore localization⁴³. Moreover, accumulation of BubR1 to kinetochores in *Drosophila spc105* mutant embryos is only mildly reduced³¹. These data suggest that an alternative pathway recruits Bub3/BubR1 to the kinetochore. Therefore, it is possible that a similar pathway regulates Bub3/BubR1 localization on the tether. The observation that the dynamics of the Bub3/BubR1 complex on the kinetochore and tether are dramatically different does not favor this idea. Indeed, while Bub3 and BubR1 dissociate from kinetochores attached to microtubules in metaphase, they remain abundant on broken chromatids well into anaphase. Similarly, both proteins accumulate rapidly on laser-induced breaks in all stages of mitosis including anaphase. This suggests that different signaling events control the dynamics of BubR1/Bub3 on the kinetochore and tether. Alternatively, a similar pathway may recruit and dissociate BubR1/Bub3 at the kinetochore and tether, but the signals controlling the dynamics of both proteins on the tether may be more robust and resistant to the global activation of APC/C during anaphase. Studies in mammalian cells indicate that Polo-like-kinase1-dependent phosphorylation of BubR1 on a KARD sequence promotes its association with PP2A-B56 α at the kinetochore^{20, 21}. BubR1-associated PP2A-B56 α is thought to counteract Aurora B-dependent KMN network phosphorylation, thereby

stabilizing Kinetochore-Microtubule attachment. In addition, it promotes the dissociation of BubR1 from the kinetochore by dephosphorylating Mps1-dependent phospho-sites on Knl1/Spc105/Spc7/Blinkin³⁴. Interestingly, *Drosophila* Polo localizes on the tether and promotes proper segregation of broken chromatids⁹. Polo may mediate BubR1 dynamics on the tether via the phosphorylation of its KARD sequence and its subsequent association with PP2A-B56 α . It will therefore be interesting to monitor the dynamics of PP2A-B56 α in mitotic cells with broken chromosomes and to assess the role of Polo and the BubR1 KARD sequence on BubR1 recruitment and function on the tether.

One clue to the pathway that recruits BubR1 to DNA breaks derives from the observation that *Drosophila* BubR1 localizes on uncapped telomeres and this recruitment is attenuated in DNA damage checkpoint-compromised cells, including *tefu/ATM*, *mus304/ATRIP* and *grapes(grp)/checkpoint 1(chk1)* mutants⁴⁴. Uncapped telomeres resemble DSBs, making it reasonable to speculate that a similar pathway could recruit BubR1 to both uncapped telomeres and I-Crel and laser-induced DSBs. While BubR1 ectopic localization on DSBs in mitosis does not depend on Grp/Chk1⁹, it could depend on upstream DDR events, such as the ATM-dependent phosphorylation of H2Az. It is interesting to note that in mammals, the presence of DSBs in mitosis activates ATM, which phosphorylates H2Ax (H2Az in *Drosophila*), promoting γ H2Ax accumulation on DSBs⁵.

Our work demonstrates that one function of Bub3/BubR1 on the tether is to sequester Fzy, which mediates local APC/C inhibition. Fzy recruitment to the tether is largely, but not exclusively, mediated by BubR1's KEN box. Our findings that some *bubR1-KEN* mutant cells show GFP::Fzy on the tether suggest that an additional BubR1 motif other than the KEN box helps recruit Fzy to the tether. Alternatively, other proteins associated with the tether may sequester Fzy and promote APC/C inhibition. This idea is unlikely given that BubR1 and Mad2 are the sole proteins identified thus far whose interactions

with Cdc20(Fzy) promote APC/C inhibition, and we found that Mad2 is not recruited to the tether⁹. The fact that the Bub3/BubR1 complex can inhibit the APC/C without Mad2 is somewhat surprising given that previous work on SAC activity demonstrated that Mad2 association with Cdc20(Fzy) is a prerequisite for efficient Bub3/BubR1 binding to Cdc20(Fzy) and subsequent inhibition of APC/C^{45, 46}. More surprising is the fact that tether-associated Bub3/BubR1 inhibits the APC/C locally well into anaphase; a period during which the APC/C is globally active. This raises the question as to why the APC/C must be locally inhibited on the tether during anaphase? Our hypothesis is that BubR1-mediated inhibition of the APC/C around the tether protects key components required to maintain the integrity of the tether, thereby facilitating faithful broken chromatid segregation. Support for this idea derives from our findings that a BubR1 mutant lacking the KEN box shows dramatic reduction of GFP::Fzy recruitment to the tether, which correlated with severe defects in broken chromatid segregation. Indeed, the movement of the broken fragments is much slower and the accuracy of their segregation dramatically reduced. These phenotypes are associated with an elevated frequency of micronuclei formation. Further studies aimed at elucidating the nature of the tether will illuminate the Bub3/BubR1-mediated mechanism that maintains the tether and facilitates the proper segregation of broken chromatids.

Experimental Procedures

Fly strains

Flies were grown on corn flour and yeast extract medium in standard conditions, at 25°C. The H2Az-RFP (previously named H2Av-RFP) stock was obtained from the Bloomington stock center. The GFP::Fzy stock was described in ⁴⁰. The transgenic stock expressing I-Crel is described in ²². The *bubR1*¹ and *bub3*¹ mutant alleles are described in ^{25, 38}. The *bubR1-KEN* and *bubR1-KD* mutants are described in ¹³. Stock expressing RFP::Bub3 and GFP::BubR1 truncated construct were obtained from BestGene. The genotypes of the larvae used in this work are listed in table S1.

Plasmids cloning

All plasmids were verified by sequencing before being injected into flies to generate transgenic stocks (Bestgene Inc., USA).

BubR1 truncated plasmid construct

All constructs were derived from a plasmid containing full-length BubR1 cDNA, using Gateway standard procedure. PCR products using the oligonucleotides listed in table S2 were inserted into the pDONR/Zeo vector (Life Technologies) to create entry clones. We generated the construct [Δ 763-1055] by two-step PCR. The first PCR used four oligonucleotides (F1, Δ 3NTR, Δ 3CTF and R1). From these products, a second PCR was performed using F1 and R1 oligonucleotides. Entry vectors containing the truncated BubR1 sequence were recombined into the pUbi-GFP-GAT vector containing the ubiquitin promoter and an N terminal GFP tag.

Bub3 genomic DNA extraction

Genomic DNA was extracted and purified using adult y¹w¹¹¹⁸ Drosophila stock using standard procedure (REF).

mRFP-Bub3 cloning

The RFP::Bub3 construct was obtained by multi-step cloning: first, 900nt upstream of Bub3 initiation codon was amplified using the Bub3prom-F and Bub3prom-R oligonucleotides, introducing KpnI and XhoI restriction sites, respectively (Table S2). After digestion, the product was ligated into pBluescript

KS (Stratagene). The genomic Bub3 sequence with its 3'UTR was amplified with Bub3gen-F and Bub3gen-R, introducing SmaI and XbaI sites and cloned into the pBS KS Bub3 promoter plasmid (Table S2). mRFP was amplified from pCaSpeR4 mRFP-BubR1 (from R. Karess) using mRFP-F and mRFP-R, introducing XhoI and SmaI sites and a linker coding for GAGAGAGA after the mRFP sequence. Ligation of this product resulted in the final pBlueScript KS g>mRFP-Bub3 vector. This construct was then transferred into pCaSpeR4 vector using KpnI and XbaI restriction sites.

GFP-CycBNt-Bub3 cloning

CycBNt sequence was amplified from pDONR/Zeo-CycBNt vector obtained from Genscript using CycBNt-Gat-F (which contains the ATTB1 gateway sequence) and Bub3-Lnk-CycBNt-R oligonucleotide (which adds a GAGAGAGA linker to the C terminus of CycBNt)(table S2). The Bub3 genomic sequence containing the GAGAGAGA linker on its N terminus was amplified using the pBlueScript KS g>mRFP-Bub3 vector and the Lnk-Bub3-F and Bub3-R (with an ATTB2 gateway sequence) oligonucleotides (table S2). The complete sequence was amplified using the two PCR products and the CycBNt-Gat-F and Bub3-R oligonucleotides. The construct was recombined with the destination vector to obtain the final plasmid Ub-GFP-CycBNt-Bub3 using the standard gateway procedure.

Generation of aGFP antibody

6xHis-tagged GFP was expressed in BL21-CodonPlus cells by IPTG induction at 37°C for 4 hours. The fusion protein was subsequently purified by Immobilized Metal Affinity Chromatography (IMAC) using Ni-bound sepharose. Approximately 1mg of purified protein was used for rabbit immunization. Additional GFP protein was covalently coupled to Affi-gel 10 resin (Bio-Rad) and used for affinity purification of anti-GFP antibody from the sera.

Western Blots

Two male and two female adult flies were collected in a tube and frozen in liquid nitrogen. The flies were ground in Sample buffer (RECETTE) containing

Protease Inhibitor Cocktail (Roche) and PMSF (1mM) (Thermo Scientific). The extracts were boiled for 5min, centrifuged, and analyzed by 10% SDS-PAGE. After electrophoresis at 20mA in running buffer (380mM Glycine, 50mM Tris Base, 1% w/v SDS), proteins were transferred to nitrocellulose membrane (Protran) by western blotting at 500mA for 2h at 4°C in transfer buffer (150mM Glycine, 25mM Tris Base, 70% ethanol in distilled water). Membrane was blocked in TBST (50 mM Tris-Cl, pH 7.5. 150 mM NaCl, 0,1%v/v Tween 20(v/v)) containing 5% dried non-fat milk for one hour. The membrane was incubated overnight at 4°C with mouse anti- α -Tubulin (1:750) (Sigma Aldrich) and rabbit anti-GFP (1:1500) primary antibodies diluted in TBST containing 5% dried non-fat milk. After washing in TBST and incubation with appropriate secondary antibodies diluted at 1:5000 in TBST containing 5% dried non-fat milk, the membrane was developed with ECL using PICO or DURA kits (Pierce).

DSB generation and larval central nervous system dissection for live imaging

Double strand breaks at the rDNA locus located on the X and Y chromosomes were generated using I-Crel endonuclease under the control of a heat shock 70 promoter. Female Third instar larvae were heat shocked for 1h at 37°C in a water bath to induce I-Crel expression. After at least 1.5 hour of recovery at room temperature, the larval central nervous system was dissected in fresh PBS and transferred in a 10-15 μ l drop of PBS to a coverslip. The preparation was slightly squashed between a slide and coverslip by aspiration of the liquid with a piece of paper. The coverslip was sealed with halocarbon oil 700 (Sigma Aldrich) and observed under a microscope for 30 to 40 minutes.

Time lapse imaging and laser ablation

Live imaging was performed with either a Zeiss Axio-Observer.Z1 microscope (Carl Zeiss S.A.S.) and a 100x, 1.4 Plan-apochromat, oil objective, equipped with 491nm (100mW, Cobolt calypso) and 561nm (100mW, Cobolt Jive) lasers, a spinning disk (CSUX-A1, Yokogawa, Japan) and an emCCD Evolve camera

(Roper Scientific, Princeton Instrument)(all figure panels) or a Leica® SP8 confocal microscope with a 63X, 1.4 plan-apochromat oil objective, equipped with 488nm and 561nm lasers and Hybrid photomultipliers (Figure 3B, C and D). The imaging systems were driven by Metamorph (Molecular Vices) or Leica software.

A 355nm pulsed-laser (passively Q-switched SNV-20F-000) with 21kHz repetition rate, 0.8μJ Energy/Pulse, 16mW average power, 2kW pick power, 400ps pulse width, powered with an iLasPULSE system (Roper Scientific, Princeton Instrument) adapted to a Zeiss Axio-observer microscope was used at 20% power and one pulse of 100ms repetition rate to induce chromosome breaks.

Image analysis

Images in all figures are maximum projections (12 z steps of 0.5μm depth each). Metamorph and ImageJ (fiji) were used for image quantification. In figure 5, we measured the mean fluorescence intensity of GFP::CycBNt::Bub3 from a sum projection (6μm) at the kinetochore and tether exclusively and normalized with the fluorescence intensity at the kinetochore and tether at time -1 minute before anaphase onset. For each dataset, data points were fit to a sigmoid curve ($Y=1/(1+10^{((\text{LogEC}-X)*\text{HillSlope}))}$) using Prism (Graphpad). The hillslope (h) of the curve was used to compare the kinetics of GFP::CycBNt::Bub3 degradation between wild type and *bubR1-KEN* mutant cells.

Author Contributions

N.D and C.L. designed and executed the experiments. E.M, M.C.C., N.F., D.G.G. and DMcC executed the experiments, A.R. designed and executed the experiments, supervised the work and wrote the manuscript.

Acknowledgements

We thank Zohra Rahmani, Roger Karess, Christian Lehner, Claudio Sunkel, Jordan Raff and Rachel Oliveira for sharing reagents. We thank all lab members for technical helps and fruitful discussion. N.D. was supported by the University of Bordeaux. C.L. and E.M. were supported by ANR-12-PDOC-0020-01/ARC2-ChromSCeD. E.M. was also supported by Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS). M.C.C. was supported by the University of Bordeaux. N.F. was supported by ATIP-AVENIR/INCa 2010-291 and Conseil Régional d'Aquitaine (20111301010). D.G.G. was supported by ERC-STG-2012 GA311358-NoAneuploidy. D.McC was supported by ANR-13-BSV2-0015-01-POLARFLUX and Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS). A.R. was supported by ERC-STG-2012 GA311358-NoAneuploidy, Conseil Régional d'Aquitaine (20111301010), and. CNRS

Figure legend

Figure 1

The Bub3 Binding Domain of BubR1 is necessary and sufficient for BubR1 localization on the tether

(A) Scheme of BubR1 full length (FL) domains identified with a secondary structural prediction algorithm (globprot), and the BubR1 truncated versions along with their localization (+) or not (-) on the kinetochore (KT) or tether. The numbers correspond to the position of the first and last amino acid of the BubR1 truncation construct. The 337-755[E481K] contains a substitution of the Glutamate at position 481 by a lysine. The Glutamate 481 is predicted by Clustal alignment to be the equivalent of the Glutamate at position 406 in BubR1 murine sequence. E406 has been shown to be essential for BubR1 interaction with Bub3²³. The BubR1 constructs are fused with GFP on their N terminal.

(B) Western blot of the GFP::BubR1 fusions from transgenic adult flies using anti-GFP antibodies and anti- α Tubulin (α Tub) as loading control.

(C) Time-lapse images of neuroblasts expressing I-Crel and labeled with H2Az::RFP (Red) and the indicated GFP::BubR1 truncated construct (Cyan). Early and late anaphase corresponds to 2 and 4 minutes after anaphase onset respectively. The kinetochore and tether localizations of the GFP::BubR1 constructs are indicated with a yellow arrow and a cyan arrowhead respectively. The white arrowheads point to the I-Crel-induced acentric chromatids. The cell is delineated with a white dashed line. Scale bar: 10 μ m.

Figure 2

Bub3 and BubR1 localize on I-Crel and Laser-induced DNA breaks

(A) Bub3 localizes on the I-Crel-induced tether. Time-lapse images of neuroblasts expressing I-Crel and labeled with H2Az::GFP (Red) and RFP::Bub3 (Cyan). The yellow arrow and Cyan arrowhead indicates the localization of RFP::Bub3 on kinetochores and tethers respectively. The white

arrowhead points to the I-Crel-induced acentric chromatids lagging at anaphase.

(B) Bub3 does not localize on kinetochore and tether in *bubR1*¹ mutants. Time-lapse images of *bubR1* mutant neuroblasts expressing I-Crel and labeled with H2Az::GFP (Red) and RFP::Bub3 (Cyan). The white arrowheads point to the I-Crel-induced acentric chromatids.

(C) BubR1 does not localize on the kinetochore and tether in 56% and 78% *bub3* mutant cells respectively (n=9). Time-lapse images of *bub3* mutant neuroblast expressing I-Crel and labeled with H2Az::RFP (Red) and GFP::BubR1 (Cyan). The white arrowheads point to the I-Crel-induced acentric chromatids.

Bub3 **(D)** and BuBR1 **(E)** localize on Laser-induced DNA damage. Time-lapse images of neuroblasts labeled with H2Az::GFP (Red) and RFP::Bub3 or GFP::BubR1 (Cyan) before and after laser ablation. The yellow circle corresponds to the zone of laser ablation. The white arrowhead indicates the laser-induced damage. The cyan arrowheads point to the accumulation of Bub3 or BuBR1 at the site of the chromosome damage. Time min:sec. The cells are delineated with a white dashed line. Scale Bar: 10μm.

Figure 3

***bubR1-KEN*, *bubR1* and *bub3* mutants exhibit severe defects in broken chromatid segregation.**

(A) Time-lapse images of *bub3* mutant neuroblasts expressing I-Crel and labeled with H2Az::RFP. The top row shows an example of a dividing cell with equal partition of the broken X chromatids (white arrows) which will produce euploid daughter cells. Bottom row shows an example of a cell with abnormal segregation of broken chromatids, where three X broken chromatids segregate in one daughter cell (white arrows). This division will produce two aneuploidy daughter cells. The pink arrowheads, indicate the time at which the last acentric fragments move poleward. The yellow arrow points to the micronuclei formed by the mis-segregated acentric chromatids. Time Min:Seconds. Scale Bar: 10μm.

(B) Histogram showing the frequency of neuroblast division with improper segregation of broken chromatids in wild type (WT), *bubR1-KD(2X)*, *bubR1-KEN(2X)*, *bub3¹* and *bubR1¹* mutants expressing I-Crel. n=number of cells. Fisher exact test was used to calculate P value. * corresponds to $P < 0.05$.

(C) Scattered dot blot showing the time at which the last acentric chromatid starts moving poleward in wild type (WT), *bubR1-KD(2X)*, *bubR1-KEN(2X)*, *bub3* and *bubR1¹* mutants. The black lines correspond to $\text{mean} \pm 1\text{C}95\%$. Time 0 corresponds to anaphase onset. n=number of cells. Mann and Whitney non parametric test was used for calculating P values. * corresponds to $P < 0.05$.

(D) Histogram showing the frequency of neuroblast division giving rise to one daughter cell in which the acentric chromatids form micronuclei in wild type (WT), *bubR1-KD(2X)*, *bubR1-KEN(2X)*, *bub3¹* and *bubR1¹* mutants expressing I-Crel. n=number of cells.

Figure 4

Fzy recruitment to I-Crel or Laser-induced breaks depends on BubR1 KEN box

(A) Time-lapse images of wild type (WT), *bubR1-KEN* and *bubR1* mutant neuroblasts expressing I-Crel and labeled with H2Az::RFP (red) and GFP::Fzy (Cyan). The yellow and cyan arrowheads indicate the localization of GFP::Fzy on the kinetochore and tether respectively. n=number of cells. The white arrowheads point to the I-Crel-induced acentric chromatids.

(B) Time-lapse images of wild type (WT) and *bubR1-KEN* mutant cells labeled with H2Az::RFP (Red) and GFP::Fzy (Cyan) before and after laser ablation. The yellow circle corresponds to the zone of laser ablation. The white arrowhead points to the laser-induced damage. The cyan arrowheads point to the appearance of GFP::Fzy at the site of chromosome damage. The cell is delineated with a white dashed line. Scale bar: $10\mu\text{m}$.

(C) Histogram showing the percentage of cells with strong, medium, weak or no GFP::Fzy signal on tethers 3 minutes after anaphase onset.

(D) Histogram showing the percentage of cells with strong, medium, weak or no GFP::Fzy signal on laser-induced chromosome breaks 3 minutes after anaphase onset.

Figure 5

The APC/C synthetic substrate GFP::CycBNt::Bub3 is maintained on the tether during early anaphase in a BubR1 KEN box dependent manner

(A) Schematic of the APC/C synthetic substrate GFP::CycBNt::Bub3. The first 246 amino acid of Cyclin B (CycB₁₋₂₄₆) was fused on its N terminus with GFP and on its C terminus with full-length Bub3. CycBNt sequence was flanked with a 4x Glutamate-Alanine linker (L).

(B) Time-lapse images of wild type (WT), *bubR1-KEN* and *bubR1*¹ mutant expressing I-Crel and labeled with GFP::CycBNt::Bub3 (Cyan) and H2Az::RFP (red). GFP::CycBNt::Bub3 localizes on the kinetochore during metaphase in WT and *bubR1-KEN* mutant but not in *bubR1* null mutant (yellow arrow). Upon anaphase onset, the GFP::CycBNt::Bub3 signal disappears from the kinetochore but remains transiently on the tether during anaphase in wild type WT and *bubR1-KEN* mutant (cyan arrow). The dissociation of GFP::CycBNt::Bub3 signal from the tether is delayed in WT compared with *bubR1-KEN* mutant cells.

(C) Quantitative analysis of the disappearance of the GFP::CycBNt::Bub3 signal on the kinetochore and tether. The graph shows the average of total fluorescence intensities of GFP signals on kinetochores and tethers over time (see material and method for quantification of the fluorescence). The fluorescence intensities were normalized with the fluorescence intensity measured at the time point -1min. The GFP signal was measured overtime every 20 seconds. The 0 of the X axis corresponds to the anaphase onset as defined by the onset of sister chromatid separation. The data points were fit to a sigmoid curve to calculate the hillslope (h) which define the rate of GFP::CycBNt::Bub3 disappearance. The rate of GFP::CycBNt::Bub3 degradation was two-fold faster in *bubR1-KEN* mutant than in WT cells, P<0.0001 (two-tailed unpaired t-test).

(D) Scattered dot plot showing the time of complete disappearance of the signal on the tether of GFP::CycBNt::Bub3 in wild type, *bubR1-KEN* and *bubR1*¹ mutant cells from anaphase onset. The lines correspond to mean±IC95%. Mann and Whitney non-parametric test was used for calculating P values. *** corresponds to P<0.001.

Supplementary data

Supplementary Material and Method

Fly stocks

EGFP::Rad21, CenpC::EGFP, Nuf2::EGFP, Spc105::EGFP, EGFP::Mad1 and EGFP::Mps1 stocks were already described^{31-33, 36}. Mps1 and mad1 mutants were described in^{33, 37}.

GFP::Securin and Securin::GFP cloning

For GFP-Securin fusion Gateway cloning, *Drosophila* Securin cDNA was amplified from pSecurin vector (DGRC, Ref. LD16810, Bloomington, IN, USA) using the following oligonucleotides Securin-Nt-F and Securin-Nt-R (table S2) and inserted into pDONR/Zeo plasmid using standard Gateway protocol. Securin-Ct-F and Securin-Ct-R oligonucleotides were used for cloning GFP on the C-terminal of Securin in pDONR/Zeo (Table S2). Each plasmid was recombined with either pUbi-GFP-GAT or pUbi-GAT-GFP destination vector to obtain Ubi-GFP-Securin or Ubi-Securin-GFP construct.

Supplementary Figure Legend

Figure S1

The Bub3-binding domain of BubR1 is required for its localization on both the kinetochore and tether

Time-lapse images of third instar *Drosophila* larvae neuroblasts expressing I-CreI and labeled with H2Az::RFP (Red) and the indicated GFP::BubR1 truncated construct (Cyan). The kinetochore and tether localizations of the GFP::BubR1 constructs are indicated with a yellow arrow and a cyan arrowhead respectively. The white arrowheads point to the I-CreI-induced acentric chromatids. Yellow arrows indicate the localization of the GFP-labeled proteins at the kinetochore. The cell is delineated with a white dashed line. Scale bar: 10 μ m. Images are maximum projections.

Figure S2

The kinetochore proteins Spc105, CenpC, Nuf2, Mad1 and Mps1 do not localize on broken chromatids

Time-lapse images of third instar *Drosophila* larvae neuroblasts expressing I-CreI and labeled with H2Az::RFP (Red) and Spc105::GFP (**A**), CenpC::GFP (**B**), GFP::Nuf2 (**C**), GFP::Mad1 (**D**) and GFP::Mps1 (**F**) (Cyan). The white arrowheads point to the I-CreI-induced acentric chromatids. Yellow arrows indicate the localization of the GFP-labeled proteins at the kinetochore. The cell is delineated with a white dashed line. Scale bar: 10 μ m. Images are maximum projections.

(**E**) Mad1 is not required for BubR1 localization on broken chromatids. Time-lapse images of a *mad1* mutant neuroblast expressing I-CreI and labeled with H2Az::RFP (Red) and GFP::BubR1 (Cyan). The white arrowheads point to the I-CreI-induced acentric chromatids. Yellow arrows indicate the localization of the GFP-labeled proteins at the kinetochore. The cell is delineated with a white dashed line. Scale bar: 10 μ m.

(**G**) Mps1 is not required for BubR1 localization on broken chromatids. Time-lapse images of *mps1*[1] mutant neuroblast labeled with GFP::BubR1 before

and after laser ablation. The yellow circle corresponds to the zone of laser ablation. The white arrowhead points to the laser-induced damage. The cyan arrowheads point to the appearance of GFP::BubR1 at the site of chromosome damage. The cell is delineated with a white dashed line. Scale bar: 10 μ m.

Figure S3

Rad21, Securin and Cyclin B do not localize on the broken chromatids throughout mitosis

Time-lapse images of third instar *Drosophila* larvae neuroblasts expressing I-Cre1 and labeled with H2Az::RFP (Red) and Rad21::GFP (cyan, first panel), or GFP::Securin (Cyan, second panel) or GFP::Cyclin B (Cyan, third panel). The kinetochore localization of the Rad21::GFP and GFP::Cyclin B are indicated with a yellow arrow and a cyan arrowhead respectively. The white arrowheads point to the I-Cre1-induced acentric chromatids. Yellow arrows indicate the localization of the GFP-labeled proteins at the kinetochore. The cell is delineated with a white dashed line. Scale bar: 10 μ m.

Supplementary Table

Table S1

Genotype	Short name	Figure
yw; <i>bubR1</i> ¹ / <i>bubR1</i> ¹ ; p[w+, Ub>EGFP::BubR1 truncated]/ p[w+, H2Az::mRFP], p[v+, hsp70>I-Crel]	BubR1	1 and S1
yw; +; p[w+, Ub>EGFP::BubR1Δ330-762[E481K]]/ p[w+, H2Az::mRFP], p[v+, hsp70>I-Crel]	330-762[E481K]	1
yw;+; p[w+, H2Az::EGFP], p[v+, hsp70>I-Crel]/p[w+, g>mRFP::Bub3]	RFP::Bub3 H2Az::GFP	2A
yw; <i>bubR1</i> ¹ / <i>bubR1</i> ¹ ; p[w+, g>mRFP::Bub3]/ p[w+, H2Az::EGFP], p[v+, hsp70>I-Crel]	<i>bubR1</i> ¹	2B
yw, p[w+ g>EGFP::BubR1], p[v+, hsp70>I-Crel]/+; p[w+, H2Az::mRFP]/+ ; <i>bub3</i> ¹ / <i>bub3</i> ¹	<i>bub3</i> ¹	2C
yw; p[w+, g>EGFP::Bub3]/+; p[w+, H2Az::mRFP]/+	GFP::Bub3 H2Az::RFP	2D
yw p[w+, g>EGFP::BubR1]/+;+; p[w+, H2Az::mRFP]/+	GFP::BubR1 H2Az::RFP	2E
yw;+; p[w+, H2Az::mRFP], p[v+, hsp70>I-Crel]/+	WT	3
yw; <i>bubR1</i> ¹ / <i>bubR1</i> ¹ ; p[w+, H2Az::mRFP], p[v+, hsp70>I-Crel]/+	<i>bubR1</i> ¹	3
yw, p[v+, hsp70>I-Crel]/+; p[w+, H2Az::mRFP]/+ ; <i>bub3</i> ¹ / <i>bub3</i> ¹	<i>bub3</i> ¹	3
yw, p[w+, g>mRFP::BubR1-KEN]/ p[w+, g>mRFP::BubR1-KEN]; <i>bubR1</i> ¹ / <i>bubR1</i> ¹ ; p[w+, H2Az::mRFP], p[v+, hsp70>I-Crel]/+	<i>bubR1</i> -KEN(2X)	3
yw; <i>bubR1</i> ¹ / <i>bubR1</i> ¹ ; p[w+, H2Az::mRFP], p[v+, hsp70>I-Crel]/ p[w+, g>EGFP::BubR1-KD]/ p[w+, g>EGFP::BubR1-KD]	<i>bubR1</i> -KD(2X)	3
yw; p[w+, Ub>EGFP::Fzy]/+ ; p[w+, H2Az::mRFP], p[v+, hsp70>I-Crel]/+	WT	4A-C
yw, p[w+, g>mRFP::BubR1-KEN]; <i>bubR1</i> ¹ , p[w+, Ub>EGFP::Fzy]/ <i>bubR1</i> ¹ ; p[w+, H2Az::mRFP], p[v+, hsp70>I-Crel]/+	<i>bubR1</i> -KEN	4A-C
yw; <i>bubR1</i> ¹ , p[w+, Ub>EGFP::Fzy]/ <i>bubR1</i> ¹ ; p[w+, H2Az::mRFP], p[v+, hsp70>I-Crel]/+	<i>bubR1</i> ¹	4A-C
yw; p[w+, Ub>EGFP::Fzy]/+ ; p[w+, H2Az::mRFP], p[v+, hsp70>I-Crel]/+	WT	4B-D
yw, p[w+, g>mRFP::BubR1-KEN]; <i>bubR1</i> ¹ , p[w+, Ub>EGFP::Fzy]/ <i>bubR1</i> ¹ ; p[w+, H2Az::mRFP], p[v+, hsp70>I-Crel]/+	<i>bubR1</i> -KEN	4B-D
yw; p[w+, H2Az::mRFP], p[v+, hsp70>I-Crel]/ p[w+, Ub>EGFP::CycBnt::Bub3]	WT	5
yw, p[w+, g>mRFP::BubR1::KEN]; <i>bubR1</i> ¹ / <i>bubR1</i> ¹ ; p[w+, H2Az::mRFP], p[v+, hsp70>I-Crel]/ p[w+, Ub>EGFP::CycBnt::Bub3]	<i>bubR1</i> -KEN	5
yw; <i>bubR1</i> ¹ / <i>bubR1</i> ¹ ; p[w+, H2Az::mRFP], p[v+, hsp70>I-Crel]/ p[w+, Ub>EGFP::CycBnt::Bub3]	<i>bubR1</i> ¹	5
yw;+; p[w+, H2Az::mRFP], p[v+, hsp70>I-Crel]/p[w+, g> Spc105::EGFP]	Spc105::GFP H2Az::RFP	S2

yw;+; p[w+, H2Az::mRFP], p[v+, hsp70>I-CreI]/p[w+, g>CenpC::EGFP]	CenpC::GFP H2Az::RFP	S2
yw;+; p[w+, H2Az::mRFP], p[v+, hsp70>I-CreI]/p[w+, g>EGFP::Nuf2]	GFP::Nuf2 H2Az::RFP	S2
yw; p[w+, g>EGFP::Mad1]/+; p[w+, H2Az::mRFP], p[v+, hsp70>I-CreI]/+	GFP::Mad1 H2Az::RFP	S2
yw; p[w+, g>EGFP::Mps1]/+; p[w+, H2Az::mRFP], p[v+, hsp70>I-CreI]/+	GFP::Mps1 H2Az::RFP	S2
yw; p[w+, H2Az::mRFP], <i>rad21</i> , p[w+, EGFP::Rad21]/ p[v+, hsp70>I-CreI]	GFP::Rad21 H2Az::mRFP	S3
yw; p[w+, H2Az::mRFP], p[v+, hsp70>I-CreI]/ p[w+, Ub>EGFP::Securin]	GFP::Securin H2Az::RFP	S3
yw; yw; p[w+, H2Az::mRFP], p[v+, hsp70>I-CreI]/ p[w+, Ub>EGFP::Cyclin B]/+; p[w+, H2Az::mRFP], p[v+, hsp70>I-CreI]/ +	GFP::Cyclin B H2Az::RFP	S3

Table S2

oligonucleotide	sequence	Construct
F1	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCGACTTTGACAATGCG AAAGAG	BubR1 FL [1-1063] [1-337] [Δ763-1055]
F2	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCGACGAACAAGCAATG CCACCTATT	[330-1063] [330-762]
F3	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCCCGGGTGGTGACAAC TTTTTGCGC	[755-1461] [755-1063]
F4	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCATAAAAAATTCCACAC TGCTGATC	[1055-1461]
R1	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCCTATTCTGCAATATC GTGTTAACTT	BubR1 FL [755-1461] [1055-1461] [Δ763-1055]
R2	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCGATCAGCAGTGTGGAA TTTTTTAT	[1-1063] [330-1063] [755-1063]
R3	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCCTAAATAGGTGGCATTGC TGTTTCGTC	[1-337]
R4	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCGCGCAAAAAGTTGTCAC CCCGG	[330-762]
Δ3NTR	AGGGATCAGCAGTGTGGAATTTTTATGCGCAAAAAGTTGTCACCACC G	[Δ763-1055]
Δ3CTF	GAAAAACCGGGTGGTGACAACCTTTTTCGCGCATAAAAAATTCCACACT GCTGATC	[Δ763-1055]
CycBNt-Gat-F	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCGACGAACAAGCAATGCG	Ub-GFP-CycBNt-Bub3

	CCTATTggcgccggagctggcgccggagcgATGGCCGCCCTTGAAAAGAAC	
Bub3-Lnk-CycBNt-R	TGGGGGACGcgctccggcgccagctccggcgccGCCAGTGGCTGTTTCTTCCA	Ub-GFP-CycBNt-Bub3
Lnk-Bub3-F	ggcgccggagctggcgccggagcgCGTCCCCCAGAGTTCAAGCTTA	Ub>GFP-CycBNt-Bub3
Bub3-R	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCCTATTATTTCTGTTTAGT CCTGGTC	Ub>GFP-CycBNt-Bub3
Bub3prom-F	ACTG ggtacc GATCTTCTTGACGGTGCTCACCTGGAG	g>mRFP-Bub3
Bub3prom-R	ACTG ctcgag TTTGTCAAGTTTCTGCTAGCAACTTG	g>mRFP-Bub3
Bub3gen-F	AGCT cccggg ATGCGTCCCCCAGAGTTCAAGCTTAAC	g>mRFP-Bub3
Bub3gen-R	CTAT tctaga AAAAGCCCAGGTTTATTATGGCCAACG	g>mRFP-Bub3
mRFP-F	ACTG ctcgag ATGGCCTCCTCCGAGGACGTC	g>mRFP-Bub3
mRFP-R	act gcccggg cgctccggcgccagctccggcgccCCTAGGGGCGCCGGTGGAGTG GGCCCTCG	g>mRFP-Bub3
Securin-Nt-F	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCGATCAGATTTTAAACAA AAA	Ub>EGFP-Securin
Securin-Nt-R	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCCTAAAATAGAAC ATCAATGCCTTCCAA	Ub>EGFP-Securin
Securin-Ct-F	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCATGGATCAGATTTTAA AGGAAA	Ub>Securin-EGFP
Securin-Ct-R	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCAAATAGAACATCAATGCC CCAA	Ub>Securin-EGFP

References

1. Melo, J. & Toczyski, D. A unified view of the DNA-damage checkpoint. *Curr Opin Cell Biol* 14, 237-245 (2002).
2. Melo, J.A., Cohen, J. & Toczyski, D.P. Two checkpoint complexes are independently recruited to sites of DNA damage in vivo. *Genes Dev* 15, 2809-2821 (2001).
3. Mikhailov, A., Cole, R.W. & Rieder, C.L. DNA damage during mitosis in human cells delays the metaphase/anaphase transition via the spindle-assembly checkpoint. *Curr Biol* 12, 1797-1806 (2002).
4. Royou, A., Macias, H. & Sullivan, W. The Drosophila Grp/Chk1 DNA damage checkpoint controls entry into anaphase. *Curr Biol* 15, 334-339 (2005).
5. Giunta, S., Belotserkovskaya, R. & Jackson, S.P. DNA damage signaling in response to double-strand breaks during mitosis. *J Cell Biol* 190, 197-207 (2010).
6. Orthwein, A. *et al.* Mitosis inhibits DNA double-strand break repair to guard against telomere fusions. *Science* 344, 189-193 (2014).
7. Peterson, S.E. *et al.* Cdk1 uncouples CtlP-dependent resection and Rad51 filament formation during M-phase double-strand break repair. *J Cell Biol* 194, 705-720 (2011).
8. Silva, B.A., Stambaugh, J.R., Yokomori, K., Shah, J.V. & Berns, M.W. DNA damage to a single chromosome end delays anaphase onset. *The Journal of biological chemistry* 289, 22771-22784 (2014).
9. Royou, A., Gagou, M.E., Karess, R. & Sullivan, W. BubR1- and Polo-Coated DNA Tethers Facilitate Poleward Segregation of Acentric Chromatids. *Cell* 140, 235-245 (2010).
10. Karess, R.E., Wassmann, K. & Rahmani, Z. New insights into the role of BubR1 in mitosis and beyond. *International review of cell and molecular biology* 306, 223-273 (2013).
11. Foley, E.A. & Kapoor, T.M. Microtubule attachment and spindle assembly checkpoint signalling at the kinetochore. *Nature reviews. Molecular cell biology* 14, 25-37 (2013).
12. Elowe, S. *et al.* Uncoupling of the spindle-checkpoint and chromosome-congression functions of BubR1. *J Cell Sci* 123, 84-94 (2010).
13. Rahmani, Z., Gagou, M.E., Lefebvre, C., Emre, D. & Karess, R.E. Separating the spindle, checkpoint, and timer functions of BubR1. *J Cell Biol* 187, 597-605 (2009).
14. Burton, J.L. & Solomon, M.J. Mad3p, a pseudosubstrate inhibitor of APC^{Cdc20} in the spindle assembly checkpoint. *Genes Dev* 21, 655-667 (2007).
15. King, E.M., van der Sar, S.J. & Hardwick, K.G. Mad3 KEN boxes mediate both Cdc20 and Mad3 turnover, and are critical for the spindle checkpoint. *PLoS ONE* 2, e342 (2007).
16. Sczaniecka, M. *et al.* The spindle checkpoint functions of Mad3 and Mad2 depend on a Mad3 KEN box-mediated interaction with Cdc20-

- anaphase-promoting complex (APC/C). *The Journal of biological chemistry* 283, 23039-23047 (2008).
17. Chen, R.H. BubR1 is essential for kinetochore localization of other spindle checkpoint proteins and its phosphorylation requires Mad1. *J Cell Biol* 158, 487-496 (2002).
 18. Larsen, N.A., Al-Bassam, J., Wei, R.R. & Harrison, S.C. Structural analysis of Bub3 interactions in the mitotic spindle checkpoint. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104, 1201-1206 (2007).
 19. Wang, X. *et al.* The mitotic checkpoint protein hBUB3 and the mRNA export factor hRAE1 interact with GLE2p-binding sequence (GLEBS)-containing proteins. *The Journal of biological chemistry* 276, 26559-26567 (2001).
 20. Kruse, T. *et al.* Direct binding between BubR1 and B56-PP2A phosphatase complexes regulate mitotic progression. *J Cell Sci* 126, 1086-1092 (2013).
 21. Suijkerbuijk, S.J., Vleugel, M., Teixeira, A. & Kops, G.J. Integration of kinase and phosphatase activities by BUBR1 ensures formation of stable kinetochore-microtubule attachments. *Dev Cell* 23, 745-755 (2012).
 22. Rong, Y.S. *et al.* Targeted mutagenesis by homologous recombination in *D. melanogaster*. *Genes Dev* 16, 1568-1581 (2002).
 23. Harris, L., Davenport, J., Neale, G. & Goorha, R. The mitotic checkpoint gene BubR1 has two distinct functions in mitosis. *Experimental cell research* 308, 85-100 (2005).
 24. Taylor, S.S., Ha, E. & McKeon, F. The human homologue of Bub3 is required for kinetochore localization of Bub1 and a Mad3/Bub1-related protein kinase. *J Cell Biol* 142, 1-11 (1998).
 25. Lopes, C.S., Sampaio, P., Williams, B., Goldberg, M. & Sunkel, C.E. The *Drosophila* Bub3 protein is required for the mitotic checkpoint and for normal accumulation of cyclins during G2 and early stages of mitosis. *J Cell Sci* 118, 187-198 (2005).
 26. Basu, J. *et al.* Localization of the *Drosophila* checkpoint control protein Bub3 to the kinetochore requires Bub1 but not Zw10 or Rod. *Chromosoma* 107, 376-385 (1998).
 27. Bolanos-Garcia, V.M. *et al.* Structure of a Blinkin-BUBR1 complex reveals an interaction crucial for kinetochore-mitotic checkpoint regulation via an unanticipated binding Site. *Structure* 19, 1691-1700 (2011).
 28. D'Arcy, S., Davies, O.R., Blundell, T.L. & Bolanos-Garcia, V.M. Defining the molecular basis of BubR1 kinetochore interactions and APC/C-CDC20 inhibition. *The Journal of biological chemistry* 285, 14764-14776 (2010).
 29. Kiyomitsu, T., Murakami, H. & Yanagida, M. Protein interaction domain mapping of human kinetochore protein Blinkin reveals a consensus motif for binding of spindle assembly checkpoint proteins Bub1 and BubR1. *Molecular and cellular biology* 31, 998-1011 (2011).

30. Kiyomitsu, T., Obuse, C. & Yanagida, M. Human Blinkin/AF15q14 is required for chromosome alignment and the mitotic checkpoint through direct interaction with Bub1 and BubR1. *Dev Cell* 13, 663-676 (2007).
31. Schittenhelm, R.B., Chaleckis, R. & Lehner, C.F. Intrakinetochores localization and essential functional domains of Drosophila Spc105. *EMBO J* 28, 2374-2386 (2009).
32. Schittenhelm, R.B. *et al.* Spatial organization of a ubiquitous eukaryotic kinetochore protein network in Drosophila chromosomes. *Chromosoma* 116, 385-402 (2007).
33. Emre, D., Terracol, R., Poncet, A., Rahmani, Z. & Karess, R.E. A mitotic role for Mad1 beyond the spindle checkpoint. *J Cell Sci* 124, 1664-1671 (2011).
34. Espert, A. *et al.* PP2A-B56 opposes Mps1 phosphorylation of Knl1 and thereby promotes spindle assembly checkpoint silencing. *J Cell Biol* 206, 833-842 (2014).
35. Shepperd, L.A. *et al.* Phosphodependent recruitment of Bub1 and Bub3 to Spc7/KNL1 by Mph1 kinase maintains the spindle checkpoint. *Curr Biol* 22, 891-899 (2012).
36. Althoff, F., Karess, R.E. & Lehner, C.F. Spindle checkpoint-independent inhibition of mitotic chromosome segregation by Drosophila Mps1. *Mol Biol Cell* 23, 2275-2291 (2012).
37. Fischer, M.G., Heeger, S., Hacker, U. & Lehner, C.F. The mitotic arrest in response to hypoxia and of polar bodies during early embryogenesis requires Drosophila Mps1. *Curr Biol* 14, 2019-2024 (2004).
38. Basu, J. *et al.* Mutations in the essential spindle checkpoint gene bub1 cause chromosome missegregation and fail to block apoptosis in Drosophila. *J Cell Biol* 146, 13-28 (1999).
39. Logarinho, E. *et al.* Different spindle checkpoint proteins monitor microtubule attachment and tension at kinetochores in Drosophila cells. *J Cell Sci* 117, 1757-1771 (2004).
40. Raff, J.W., Jeffers, K. & Huang, J.Y. The roles of Fzy/Cdc20 and Fzr/Cdh1 in regulating the destruction of cyclin B in space and time. *J Cell Biol* 157, 1139-1149 (2002).
41. Watrin, E. & Peters, J.M. Cohesin and DNA damage repair. *Experimental cell research* 312, 2687-2693 (2006).
42. Huang, J. & Raff, J.W. The disappearance of cyclin B at the end of mitosis is regulated spatially in Drosophila cells. *Embo J* 18, 2184-2195 (1999).
43. Krenn, V., Wehenkel, A., Li, X., Santaguida, S. & Musacchio, A. Structural analysis reveals features of the spindle checkpoint kinase Bub1-kinetochore subunit Knl1 interaction. *J Cell Biol* 196, 451-467 (2012).
44. Musaro, M., Ciapponi, L., Fasulo, B., Gatti, M. & Cenci, G. Unprotected Drosophila melanogaster telomeres activate the spindle assembly checkpoint. *Nat Genet* 40, 362-366 (2008).
45. Kulukian, A., Han, J.S. & Cleveland, D.W. Unattached kinetochores catalyze production of an anaphase inhibitor that requires a Mad2

- template to prime Cdc20 for BubR1 binding. *Dev Cell* 16, 105-117 (2009).
46. Sudakin, V., Chan, G.K. & Yen, T.J. Checkpoint inhibition of the APC/C in HeLa cells is mediated by a complex of BUBR1, BUB3, CDC20, and MAD2. *J Cell Biol* 154, 925-936 (2001).

Figure 1

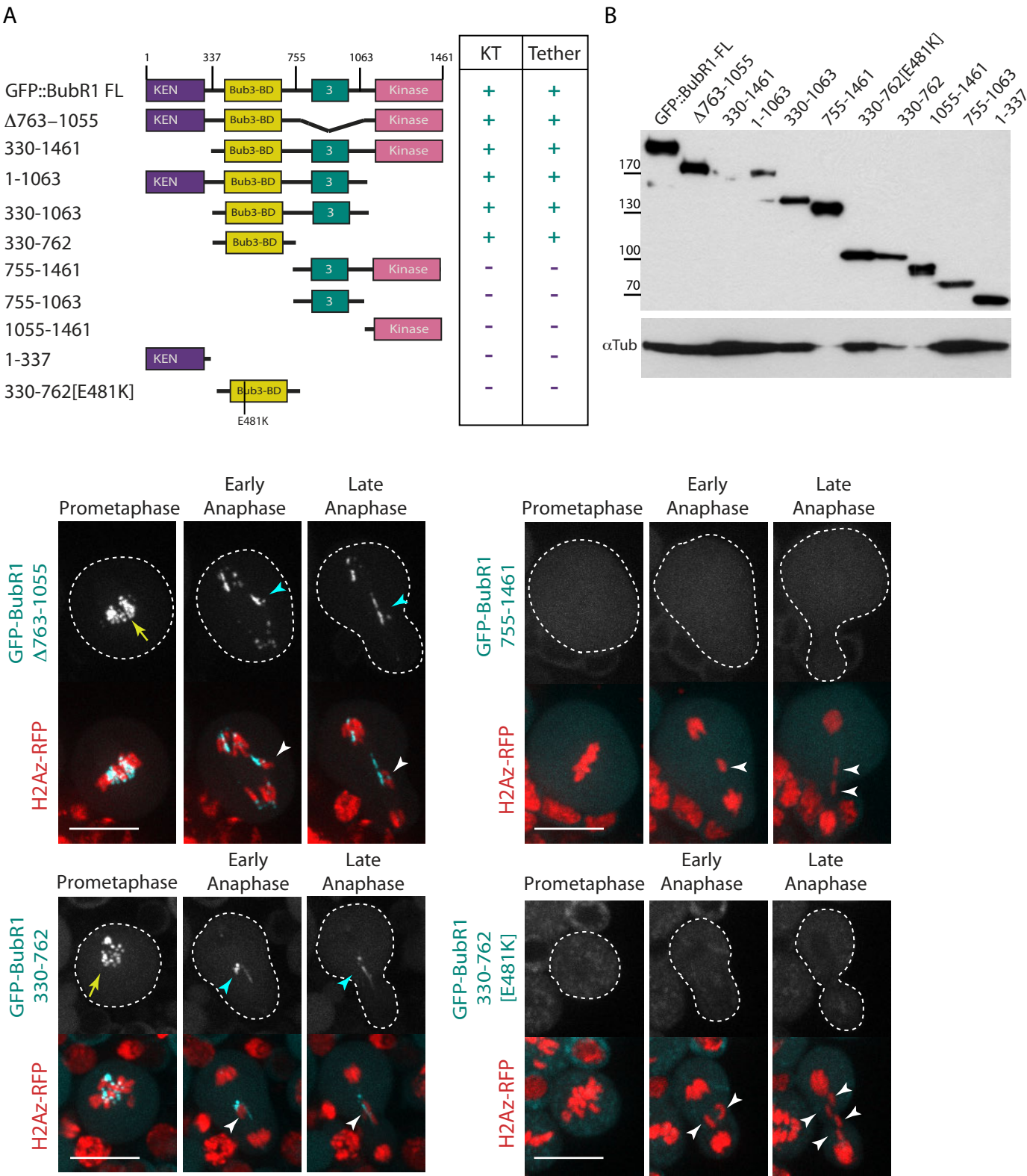
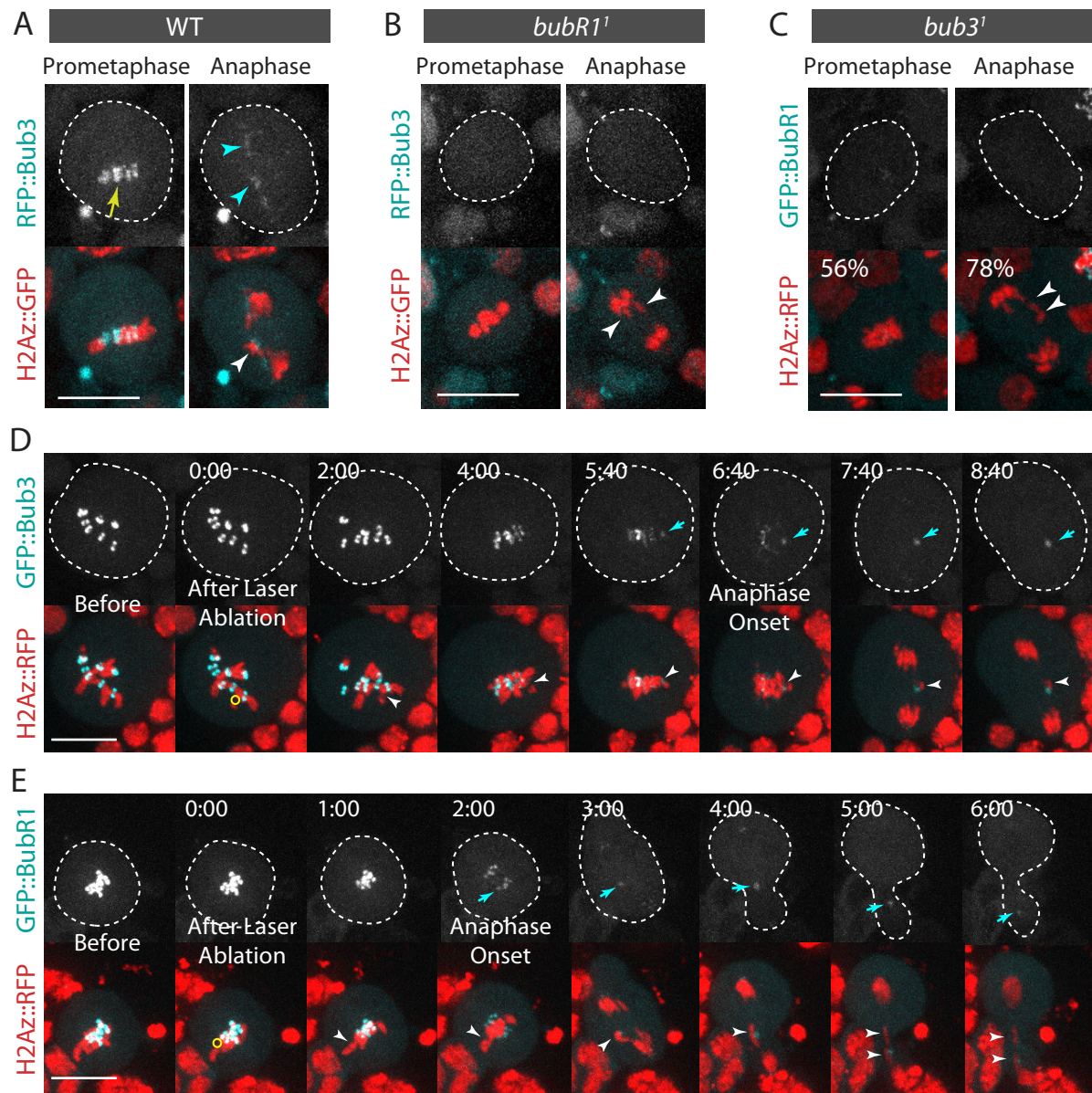


Figure 2



A

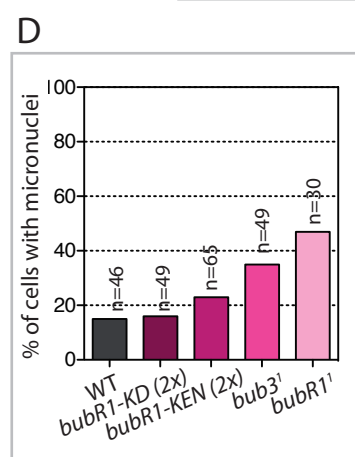
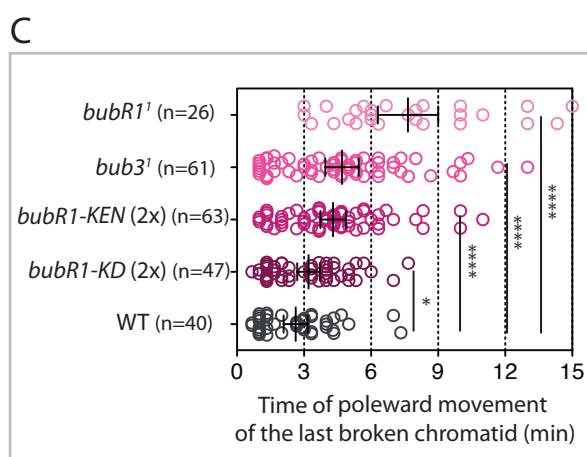
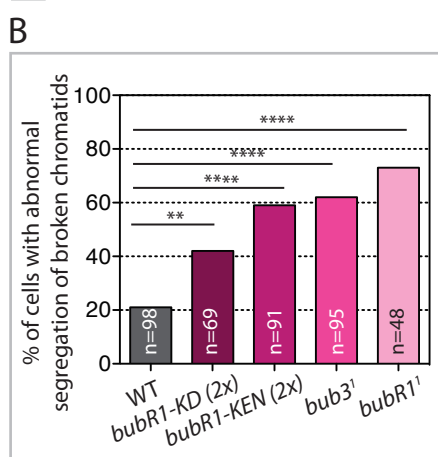
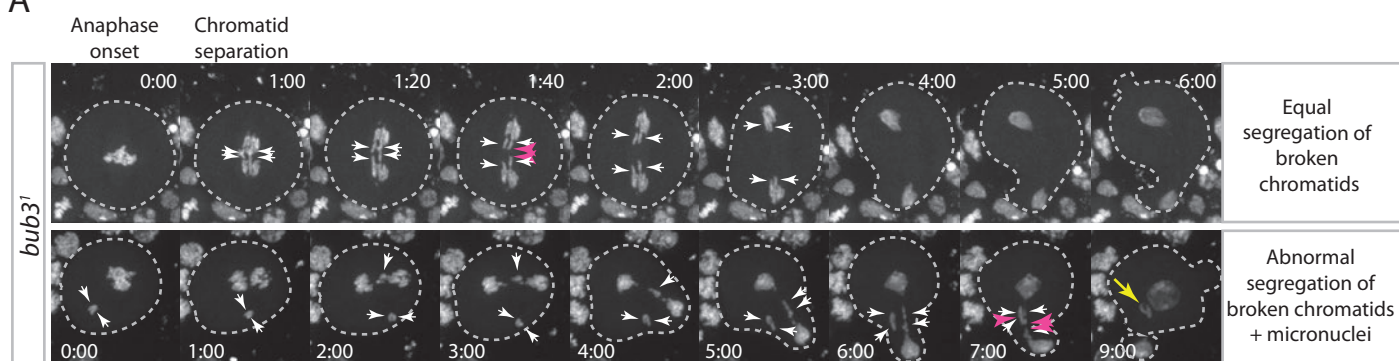


Figure 4

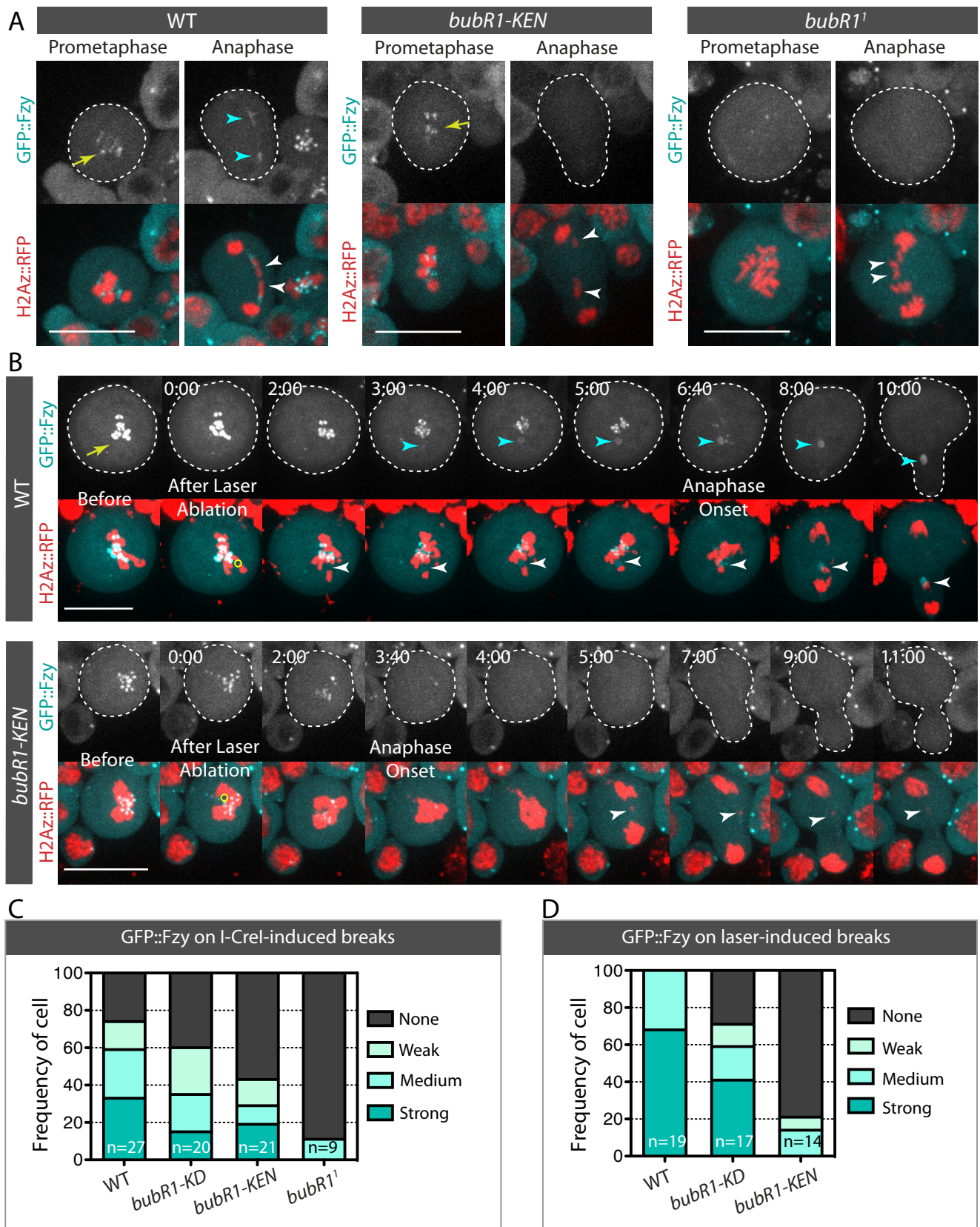


Figure 5

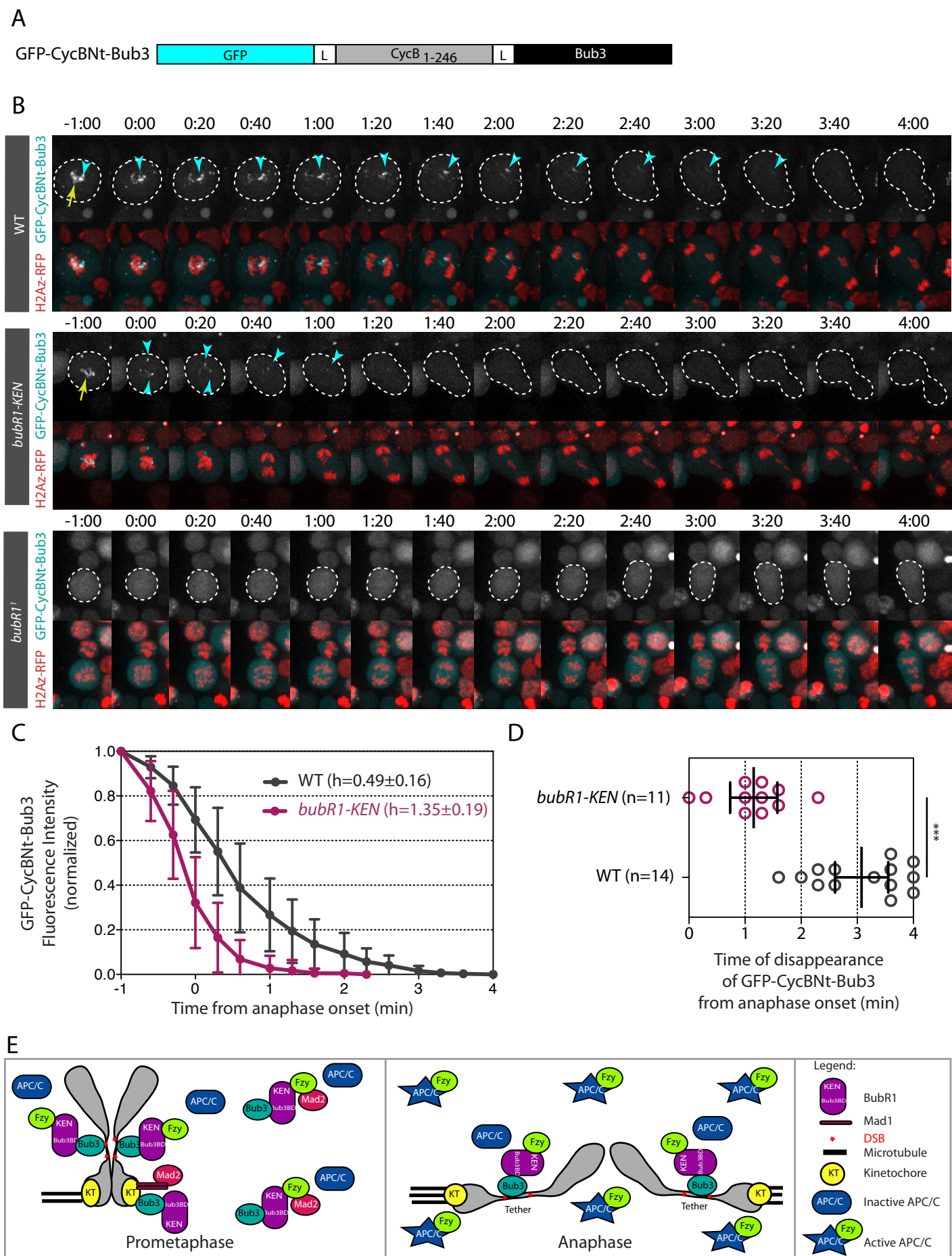


Figure S1

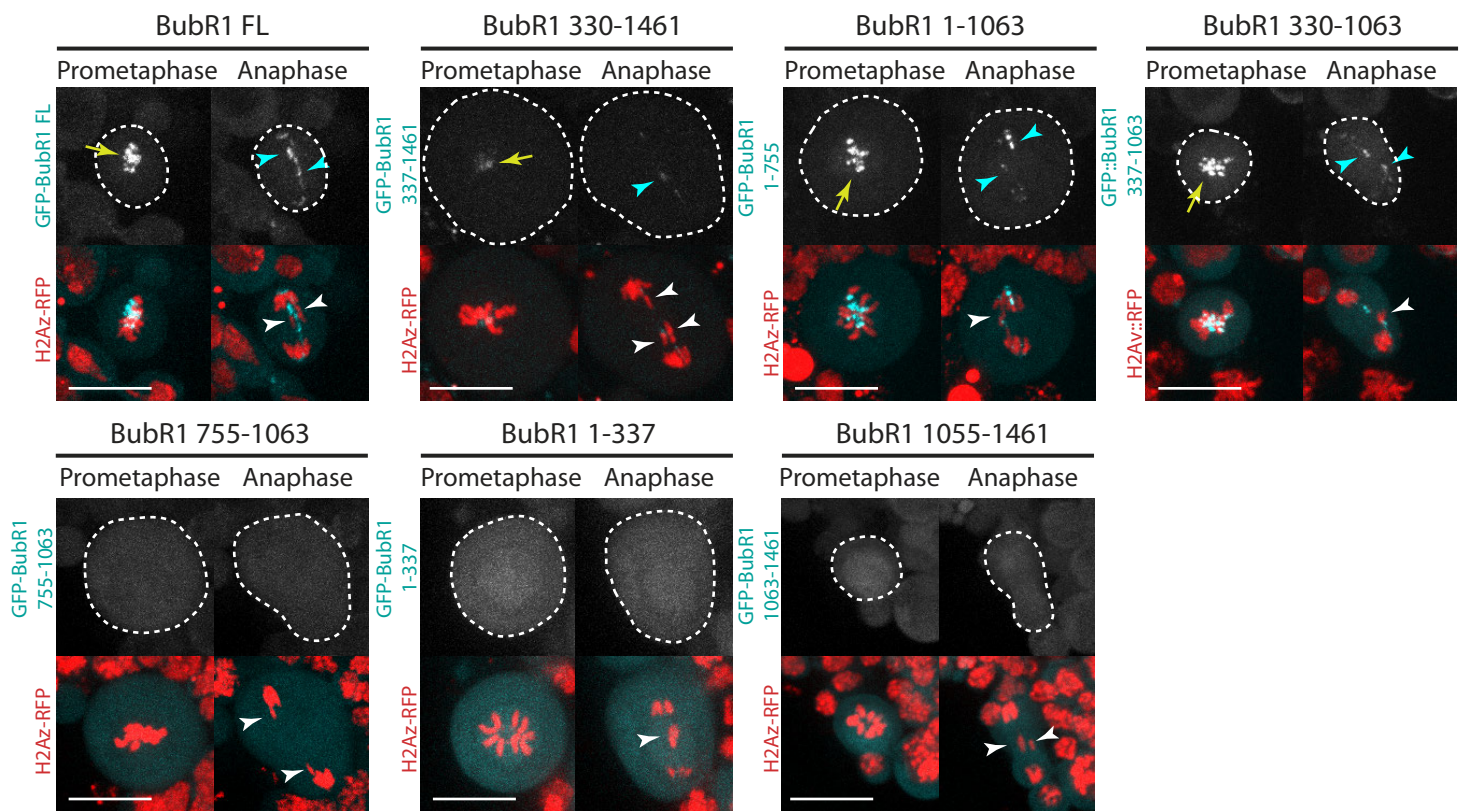


Figure S2

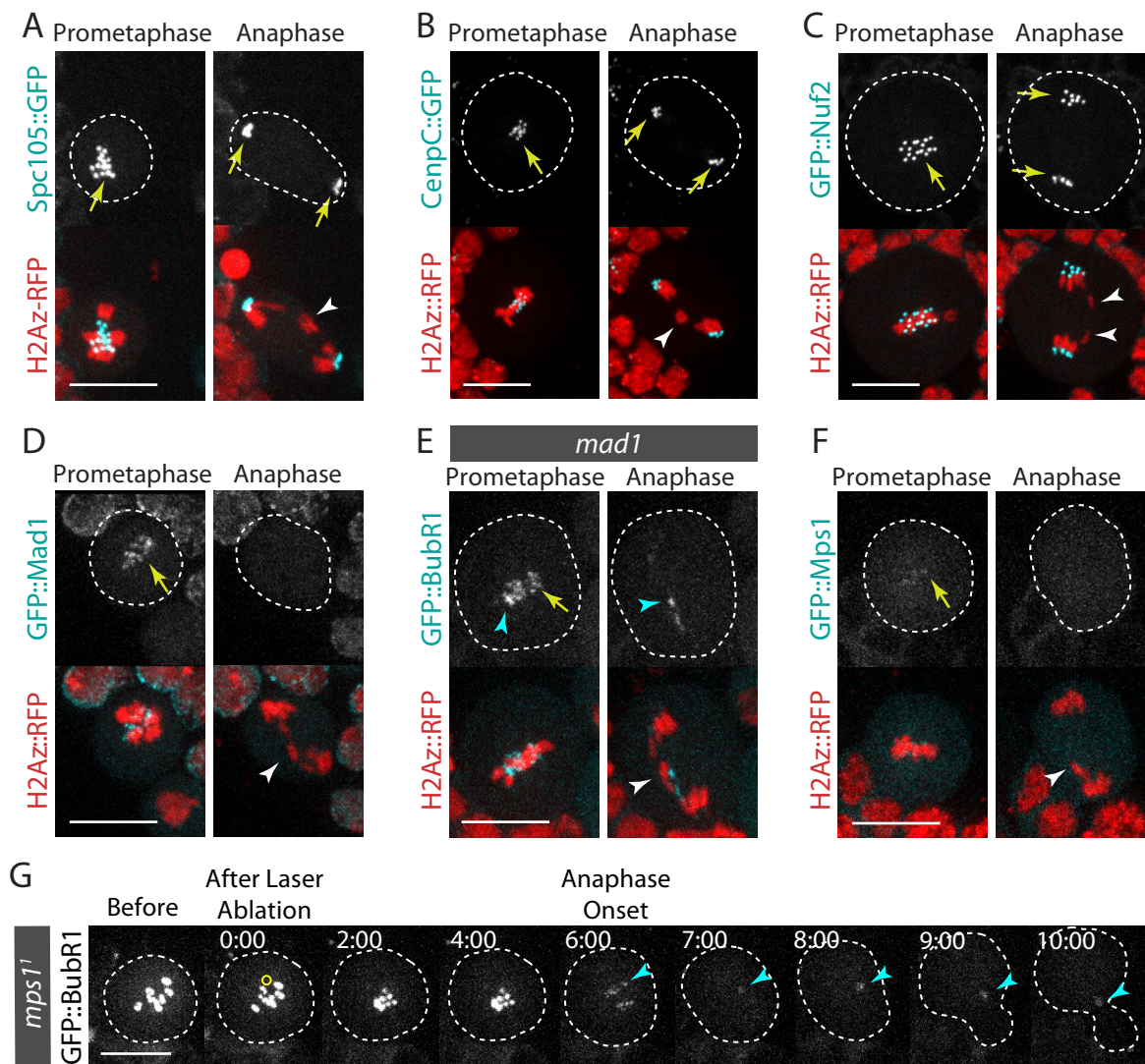
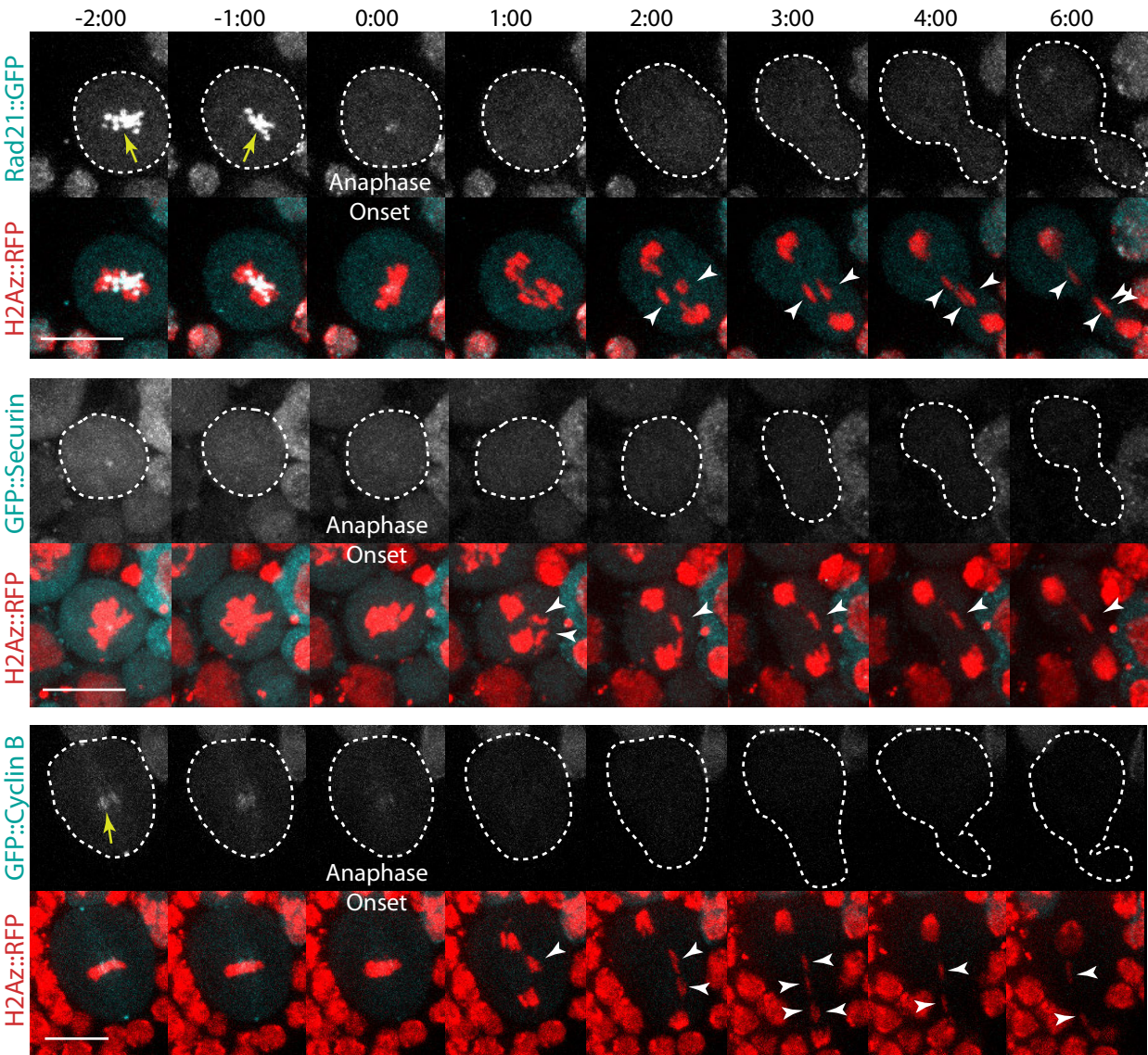


Figure S3



2) Résultats complémentaires

a) La mutation de l'hélicase Mus309 (Blm) entraîne une létalité synthétique avec I-CreI

Nous avons procédé à une approche par tests de létalité pour essayer de déterminer quel est le mécanisme de réparation de l'ADN intervenant dans la réparation des cassures. Le but de cette approche est de tester des mutants des systèmes de réparation de l'ADN dans le contexte de cassures induites par I-CreI, avec les contrôles appropriés. L'idée sous jacente est qu'en présence de cassures, une population d'individus portant une mutation dans le système de réparation de cassures dues à I-CreI subira une mortalité plus importante que si celui-ci est intact. Nous avons testé des mutants dans les différents systèmes de réparation des cassures double brin. Hus1 fait partie d'un complexe appelé 9-1-1 (avec Rad9 et Rad1) qui intervient dans le point de contrôle de la réplication, et dans la réparation de cassures dans l'ADN (Parrilla-Castellar et al., 2004). Nous avons étudié la mutation nulle décrite chez la drosophile, Hus1³⁷ (Abdu et al., 2007). Nous avons également testé la Ligase IV, qui est nécessaire à la réparation des cassures double brin par Jonction des Extrémités Non-Homologues (NHEJ) (Chen et al., 2001; McVey et al., 2004). Plus précisément, nous avons testé deux allèles mutants de celle-ci, dont un, LigIV⁵, a été montré comme induisant une sensibilité aux radiations chez la drosophile à l'état hétérozygote (Gorski et al., 2003).

Nous avons enfin testé l'hélicase Blm (également appelée Mus309), qui permet l'invasion/échange de brins lors de la recombinaison homologue (Hickson, 2003; Johnson-Schlitz and Engels, 2006; Weinert and Rio, 2007), et permet aussi d'empêcher la recombinaison avec des séquences trop divergentes, et ainsi préserver l'intégrité du génome (Kappeler et al., 2008). Nous avons testé le mutant mus309^{N1} (Blm^{N1}), qui perturbe la recombinaison homologue chez la drosophile, et qui est hypersensible aux radiations à l'état homozygote. Celui-ci est considéré équivalent à un mutant nul (McVey et al., 2007).

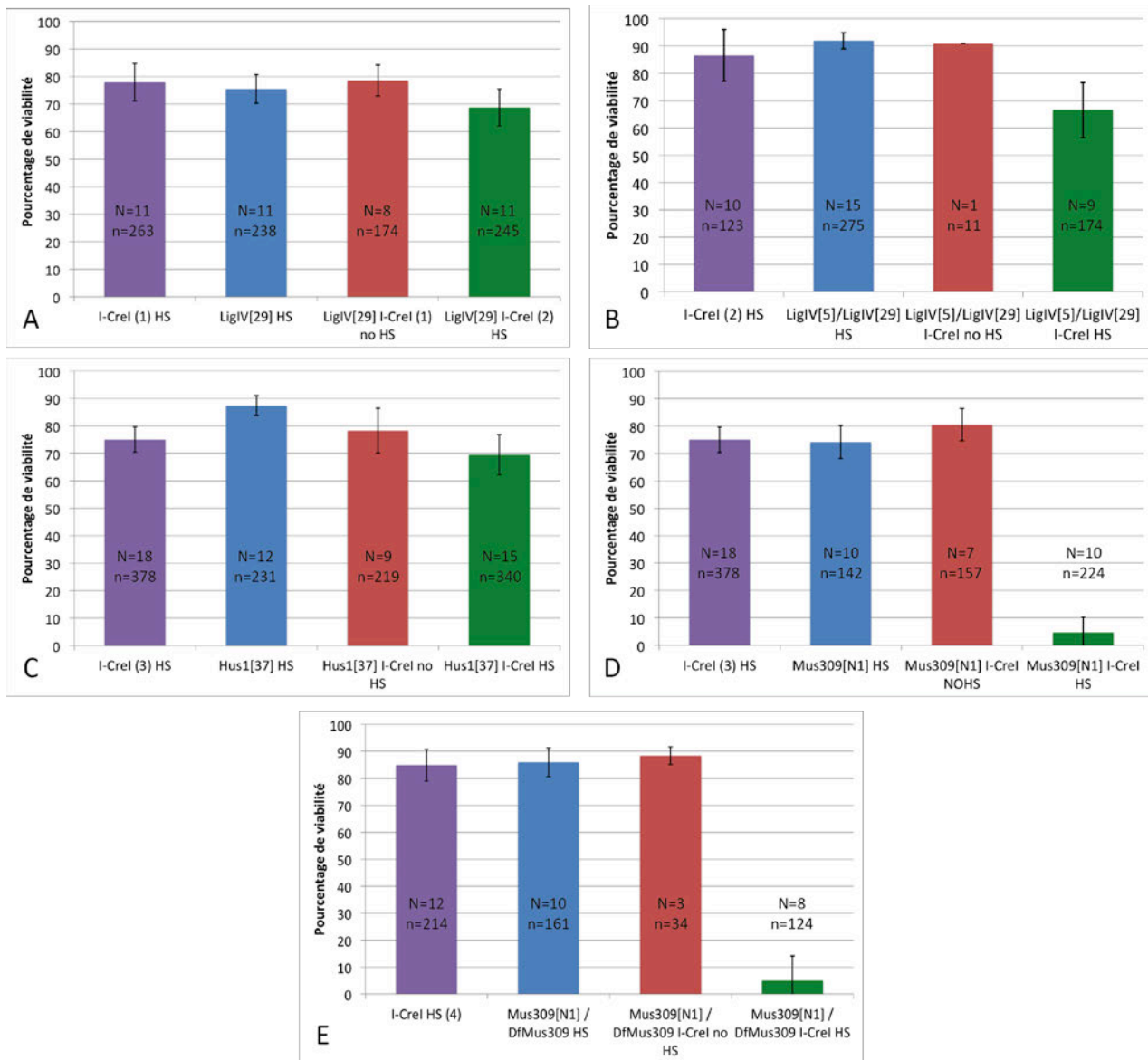


Figure 9 : Le mutant Mus309 est sensible à l'expression de I-CreI. Pourcentage de viabilité de différents mutants des voies de réparation des cassures double brin (N est le nombre d'expériences indépendantes, n est le nombre d'individus). En bleu le témoin portant la mutation soumis à choc thermique (HS, qui n'induit pas de cassure car ce témoin ne porte pas le gène I-CreI). En rouge le témoin portant la mutation et le gène I-CreI mais non soumis à choc thermique. En vert la lignée portant la mutation et le gène I-CreI qui a été induit par choc thermique. En violet, le témoin ne portant que le gène I-CreI induit par choc thermique. Les contrôles portent, le cas échéant, la même insertion d'I-CreI que les lignées testées. A) Test d'une lignée portant l'allèle mutant *LigIV*²⁹, déficient pour le NHEJ. B) Test d'une lignée trans-hétérozygote *LigIV*²⁹/*LigIV*⁵ pour confirmer le résultat du volet A). C) Test d'une lignée portant l'allèle mutant *Hus1*³⁷ impliqué dans la signalisation des cassures de l'ADN lors de la réplication. D) Test d'une lignée portant l'allèle mutant *Mus309*^{N1} déficient pour le HR. E) Test d'une lignée trans-hétérozygote *Mus309*^{N1} sur sa déficience *DfMus309*^{N1} pour valider le résultat obtenu en D).

La mutation de *LigIV* n'a pas d'impact sur la viabilité des individus en présence de cassures double-brin (Figure 9A). En effet, avec la mutation *LigIV*²⁹, le taux de viabilité est de 69% (IC95% de $\pm 6,7$), soit comparable aux contrôles (entre 69 et 78%). Nous avons confirmé ce résultat en étudiant ensuite un trans-hétérozygote *LigIV*²⁹/*LigIV*⁵, dont la viabilité est faiblement altérée en présence de cassures double brin (Figure 9B, 67% de viabilité, IC95% de $\pm 10\%$, comparée aux contrôles entre 87 et 92%). Ce qui laisse à penser que le mécanisme de réparation de l'ADN dans lequel est impliqué LigIV (le NHEJ) n'est pas le système principal de réparation de ce type de cassures.

Nous avons ensuite testé le mutant nul *Hus1*³⁷, et cette mutation n'entraîne pas de diminution significative de la viabilité des individus (Figure 9C, 70% de viabilité, IC95% de $\pm 7\%$, avec des contrôles entre 75 et 87%). Le complexe 9-1-1 impliqué dans la signalisation des cassures lors de la réplication de l'ADN n'intervient donc pas dans la réparation de ce type de cassure.

Nous avons enfin testé le mutant *Mus309*^{Nl} (également appelé *Blm*^{Nl}). Celui-ci entraîne une très forte baisse de la viabilité (Figure 9D, 5% de viabilité, IC95 de $\pm 6\%$) par rapport aux contrôles (entre 74 et 81%), ce qui montre que l'hélicase Bloom entraîne une létalité synthétique lors de l'induction de I-CreI. On peut ainsi penser qu'elle est impliquée dans la réparation des cassures double brin induites par I-CreI. Bloom étant nécessaire à la recombinaison homologue, on peut raisonnablement supposer que c'est la recombinaison homologue qui intervient majoritairement pour la réparation de ces cassures.

Afin de confirmer le résultat observé, et en particulier vérifier qu'il est bien dû à la mutation de Mus309 et non à une mutation voisine, nous avons enfin effectué des tests de létalité sur un trans-hétérozygote de *Mus309*^{Nl} sur sa déficience Df(3R)Exel8154 (notée ici DfMus309). On observe ici également une très forte baisse de la viabilité à 5% (Figure 9E avec IC95% de $\pm 9\%$) comparée aux contrôles (entre 85 et 88%). Ce test a ainsi validé notre observation sur l'implication de Mus309/Blm, et vraisemblablement de la recombinaison homologue, dans la réparation des cassures double brin induites par I-CreI.

b) La mutation phosphomimétique du motif KARD de BubR1 induit un arrêt en mitose dépendant du point de contrôle de l'assemblage du fuseau mitotique (SAC)

Afin d'étudier sur notre modèle le rôle du domaine KARD de BubR1 décrit dans les cellules humaines (Kruse et al., 2013; Suijkerbuijk et al., 2012a), nous avons réalisé, en utilisant l'alignement de BubR1 humain et de drosophile, des mutants de ce domaine, qui y est localisé entre les acides aminés 679 et 696. En particulier, nous avons généré le mutant triple-phosphomimétique S685D, S691D et T695D, et le mutant triple-non phosphorylable S685A, S691A, T695A. Nous appellerons par la suite ces mutants *BubR1*^{KARD→D} et *BubR1*^{KARD→A} respectivement. Ces trois positions ont été montrées comme étant cruciales pour la régulation de l'interaction entre B56alpha et BubR1 dans les cellules humaines, comme décrit plus tôt en introduction. Nous avons donc ensuite cherché à mettre en évidence un phénotype lié à ces mutants en mitose, pour étudier par la suite leur possible rôle sur le tether. Nous avons ainsi réalisé des colorations acéto-orcéine afin de déterminer l'index mitotique des mutants porteurs de ces constructions, en fond sauvage, et en fond BubR1 nul (mutant *BubR1*¹, uniquement pour le phosphomimétique, le non phosphorylable ne sauvant pas la létalité du mutant *BubR1* nul). Le fond *BubR1* nul permet dans ce cas de déterminer si la construction étudiée permet de sauver le phénotype ou non, et le fond sauvage de savoir si la construction a un effet dominant.

La mutation du motif KARD, que ce soit en *BubR1*^{KARD→A} ou en *BubR1*^{KARD→D}, va entraîner une augmentation de l'index mitotique, en hétérozygote *BubR1*, par rapport au contrôle (Figure 10). En effet, on peut observer une augmentation d'environ 50% de l'index mitotique dans le mutant *BubR1*^{KARD→A} (index mitotique de 3,1, avec un IC95% de ±1,0) et une augmentation encore plus importante d'environ 250% dans le mutant *BubR1*^{KARD→D} (index mitotique de 5,0, avec un IC95% de ±0,3) par rapport au contrôle. On peut ainsi déduire d'après ces résultats que la mutation du motif KARD, particulièrement le phosphomimétique, entraîne un arrêt/ralentissement en mitose des cellules, qui explique l'augmentation de l'index mitotique.

Dans un mutant *BubR1*^{KARD→D} en fond *BubR1* mutant comparé à un sauvage, on peut également voir une augmentation de l'index mitotique (d'environ 350% à 6,9 avec un IC95% de ±2,1), même sans BubR1 endogène. Notre construction semble donc conserver son phénotype même en l'absence de BubR1 endogène.

Génotype	Sans Colchicine		Colchicine 30 min	
	Index mitotique	% Anaphase	Index mitotique	% Anaphase
<i>WT</i> (1) n=1614 (sans colchicine) et n=443 (colchicine 30min)	2,0 (±0,3)	7,2% (±3,0%)	11,2 (±3,7)	N.D.
<i>WT</i> (2) n=835	2,0 (±0,2)	11,8% (±1,6%)	N.D.	N.D.
<i>BubR1</i> ^{KARD→D} n=247	5,0 (±0,3)	13,1 %(±9%)	N.D.	N.D.
<i>BubR1</i> ^{KARD→A} n=486	3,1 (±1,0)	12,1% (±8%)	N.D.	N.D.
<i>BubR1</i> ¹ <i>BubR1</i> ^{KARD→D}	6,9 (±1,5)	1,2% (±0,6%)	N.D.	N.D.
<i>BubR1</i> ^{KARD→D} <i>Mad2</i> ^p	N.D.	N.D.	0,8 (±0,8)	N.D.

Figure 10 : Le motif KARD, phosphorylé, entraîne un arrêt en mitose lié au SAC.

Moyenne des index mitotiques et des pourcentages d'anaphases observés par génotype et par condition, avec n le total de champs observés de ce génotype, sur l'ensemble des préparations étudiées. Les valeurs ± entre parenthèses sont les indices de confiance à 95% correspondants.

De plus on peut voir, dans le même contexte génétique, que la mutation *BubR1*^{KARD→D}, bien qu'entraînant un arrêt en mitose comme vu précédemment, entraîne une diminution du pourcentage d'anaphases parmi les cellules en mitose en fond *BubR1* nul (1,2%, avec un IC95% de ±0,6%, comparé aux 11,8% du contrôle *WT* (2), avec un IC95% de ±1,6). L'arrêt en mitose observé serait donc un arrêt en prométaphase ou métaphase, et notre mutant aurait une action de blocage du passage en anaphase. Cet effet n'est pas observé en fond sauvage, où le pourcentage d'anaphase est sensiblement le même (aux alentours des 13%, mais avec un IC95%

de 8 à 9%) quelque soit le mutant KARD (*BubR1*^{KARD→D} ou *BubR1*^{KARD→A}) considéré, ce qui est similaire au contrôle (*WT* (1), 7,2% (±3,0%))

Ce type de blocage suggérant une activation du SAC, nous avons décidé d'étudier l'index mitotique de ce mutant *BubR1*^{KARD→D}, en fond *Mad2* nul (allèle *Mad2*^P, aussi connu comme *Mad2*^{G6595}), mutation qui est connue comme abolissant le SAC (Buffin et al., 2007; Hwang et al., 1998; Kim et al., 1998). Nous avons également traité les cellules à la colchicine, ce qui a pour effet d'activer le SAC dans les cellules où celui-ci est fonctionnel, comme dans notre contrôle (*WT* (1)). Comme on peut le voir, on observe dans ces conditions une forte diminution de l'index mitotique du mutant *BubR1*^{KARD→D} *Mad2*^P dans ces conditions (index mitotique de 0,8, avec un IC95% de ±0,8), comparé au contrôle qui, lui augmente fortement (passage d'un index mitotique de 2 dans les conditions précédentes à 11,2, avec un IC95% de ±3,7), comme attendu lors de ce type de traitement. On peut ainsi déduire de ce résultat que le mutant *BubR1*^{KARD→D} étudié induit un arrêt en mitose dépendant du SAC.

On peut donc conclure à partir de ces résultats que le mutant phosphomimétique dans le motif KARD de BubR1 induit un arrêt en prométaphase ou métaphase de mitose dépendant du SAC, et donc supposer que ce motif intervient dans la régulation de ce dernier.

c) Le domaine KAN de BubR1 intervient dans la ségrégation correcte des chromosomes acentriques, mais pas dans leur vitesse de ségrégation

Pour étudier le rôle des différents domaines de BubR1 dans la régulation de son activité au tether, nous avons observé l'impact de mutations ponctuelles altérant la fonctionnalité de ces domaines sur la ségrégation des chromosomes acentriques (cassés) en fond BubR1 nul. Nous avons testé les mutants KAN (altération de la fonction SAC par remplacement du motif KAN de BubR1 par des alanines), KENKAN (remplacement des deux motifs KEN et KAN de BubR1 par des alanines), et KENKANKD (altération de la fonction SAC et de la fonction de congression des

chromosomes de BubR1) (Rahmani et al., 2009 et données non publiées), et KARD->D (Recrutement constitutif de PP2A sur BubR1). Les résultats concernant les domaines KEN et Kinase sont intégrés dans la publication incluse précédemment, et amènent à conclure un rôle de ces deux domaines dans la ségrégation correcte des chromosomes acentriques, mais pas sur leur vitesse de ségrégation. Nous avons regardé ici l'impact de la mutation d'autres domaines sur ces éléments.

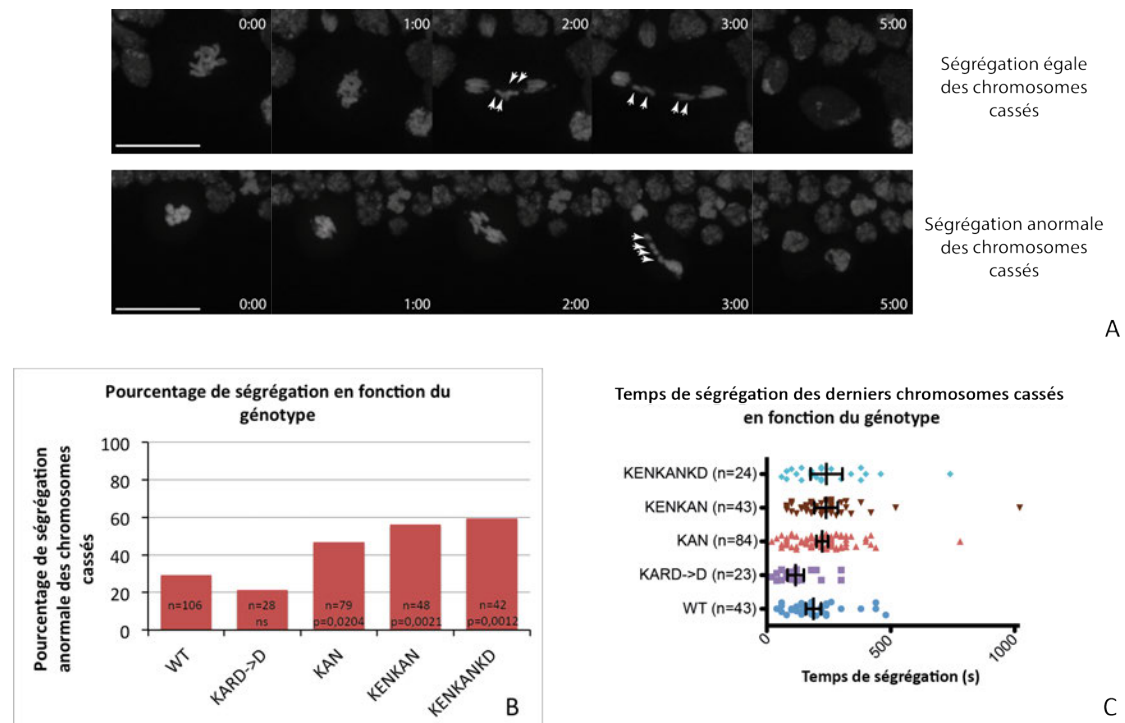


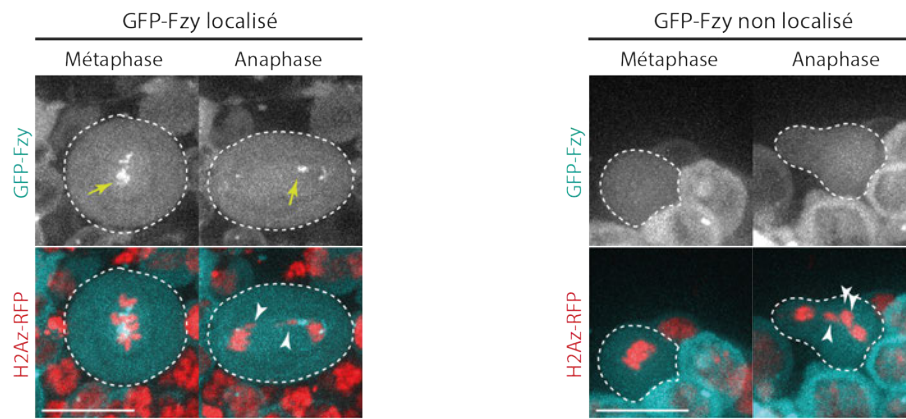
Figure 11 : La mutation du domaine KAN entraîne des défauts de ségrégation des acentriques. A) Exemples de ségrégations observées des chromosomes cassés (acentriques). En haut, une ségrégation égale, deux dans chaque cellule fille, et en bas une ségrégation anormale, quatre dans une seule des deux cellules filles. Les flèches blanches indiquent les chromosomes cassés, et la barre d'échelle marque 10 μm. B) Pourcentage de ségrégation anormale des chromosomes cassés observé en fonction de la mutation effectuée dans BubR1, en fond BubR1 nul, avec une dose de construction mutée, après génération de cassures double brin via l'induction de I-CreI. Sont indiqués n le nombre de cellules observées et la valeur p issue d'un test de Fisher exact comparatif au WT. La ségrégation des chromosomes acentriques a été étudiée dans différents mutants ponctuels de BubR1. Deux catégories ont été réalisées : Euploïde : deux pools de chromosomes identiques, dont deux acentriques, ségrègent vers chaque cellule fille. Anormale : les deux pools de chromosomes ségrégeant vers chaque pôle ne sont pas identiques. Seule ce dernier type de ségrégation est indiqué sur le graphe, en pourcentage du total. C) Temps de ségrégation du dernier acentrique après survenue de l'anaphase observé en fonction de la mutation effectuée dans BubR1, en fond BubR1 nul, avec une dose de construction mutée, après génération de cassures double brin via l'induction de I-CreI.

La mutation KARD->D ne semble pas avoir d'effet sur la ségrégation des chromosomes acentriques, qui reste similaire au sauvage (la différence avec le sauvage est non significative lors d'un test de Fisher exact, Figure 11B). Par contre, on peut observer que dès qu'on mute le domaine KAN, seul ou en combinaison avec le domaine KEN ou Kinase (mutant KD), on a une forte augmentation, significative, de l'aneuploïdie. On peut ainsi conclure de cette figure que le domaine KAN est important pour la fonction de BubR1 au tether, qui est de permettre la ségrégation correcte des chromosomes acentriques. On peut ainsi supposer que la fonction SAC de BubR1 pourrait avoir un rôle sur la ségrégation des chromosomes acentriques.

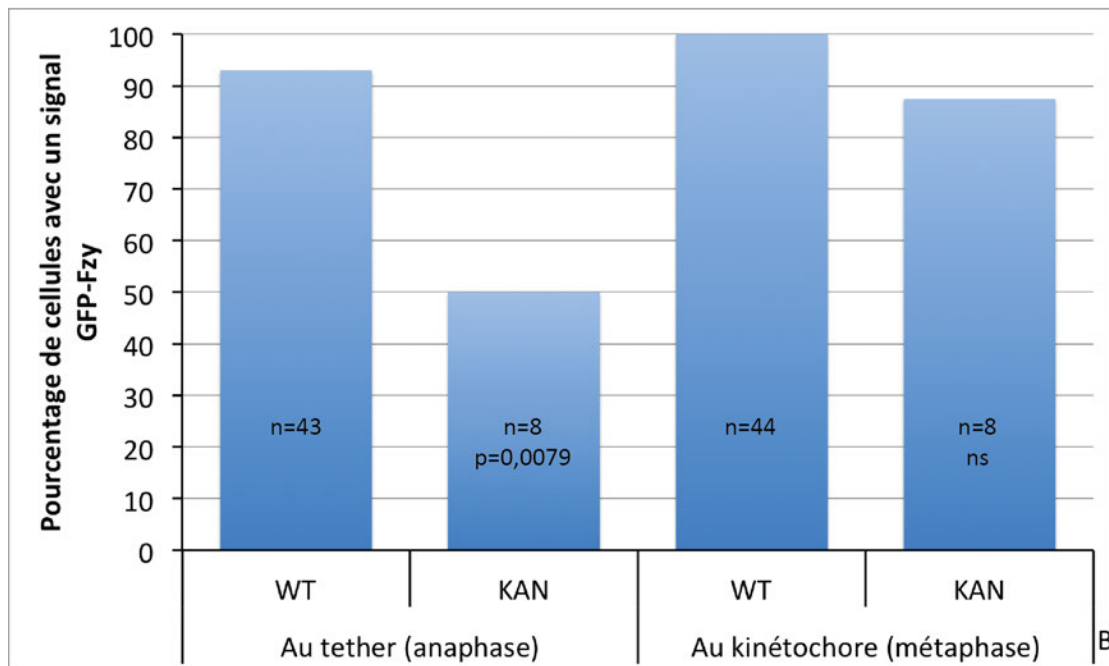
Concernant la Figure 11C, on peut voir que les mutations semblent entrainer une variation du temps de ségrégation moyen du dernier acentrique : KARD->D ayant un temps moyen de ségrégation du dernier chromosome cassé plus faible que le sauvage, et les autres mutants un temps moyen plus élevé. Pourtant, il a été confirmé par un test ANOVA (One Way ANOVA, avec un test Bonferroni de comparaisons multiples) que les différences observées ne sont pas significatives par rapport au contrôle.

d) La mutation du domaine KAN entraine une perte partielle de la localisation de Fzy (Cdc20) au tether

Dans la publication, il a été montré que Fzy (Cdc20) se localise sur le tether chez la drosophile, ce qui supporte notre hypothèse selon laquelle le rôle de BubR1 au tether serait d'y séquestrer Cdc20 afin de maintenir une inhibition locale de l'APC/C en début d'anaphase au tether, ce qui protégerait de la dégradation un substrat clé pour l'intégrité du tether. Il a également été montré que la mutation du domaine KEN ou du domaine Kinase entraine une altération de la localisation de Fzy au tether. Il a ici été étudié d'autres mutants de *BubR1*, afin de déterminer également si la dynamique de localisation de Fzy au tether y est altérée. La localisation au kinétochore a également été observée, pour servir de référence.



A



B

Figure 12 : La localisation de Fzy est altérée au tether dans les mutants BubR1. A) Exemple des localisations observées : GFP-Fzy se localise en métaphase au kinétochore puis en anaphase au tether à gauche (marquage GFP-Fzy seul en haut, et combiné en bas en cyan avec un marquage H2Az-RFP des chromosomes en rouge). A droite, GFP-Fzy ne se localise ni au kinétochore, ni au tether. Les flèches blanches indiquent les chromosomes cassés, et les flèches dorées la localisation de GFP-Fzy. Les cellules sont délimitées par une ligne pointillée blanche, et la barre d'échelle indique 10µm. B) Pourcentage de localisation de GFP-Fzy observé au kinétochore ou au tether (3min après survenue de l'anaphase) parmi l'ensemble des cellules étudiées (n est le nombre de cellules observées, p la significativité de la différence observée par rapport au contrôle WT évaluée par un test de Fisher exact).

Ces localisations ont été observées de la même manière que montrée dans les exemples de localisation de GFP-Fzy (Figure 12A), avec à gauche un exemple de localisation de Fzy au kinétochore et au tether, et à droite un exemple d'absence de localisation. On peut ainsi, à partir de l'observation de nombreuses cellules, mettre en

évidence une éventuelle altération de la dynamique de localisation de Fzy dans un mutant *BubR1*. Ici on n'observe aucune altération significative de la dynamique de localisation de Fzy au kinétochore par rapport au contrôle WT (valeurs de p non significatives en test de Fisher exact, Figure 12B). Par contre, on observe au tether une diminution du nombre de cellules où GFP-Fzy se localise de plus de 40% dans le mutant KAN. On en déduit donc que le domaine KAN de BubR1 joue un rôle important dans la localisation de Fzy au tether.

Conclusion, discussion et perspectives

1) Discussion et perspectives

Les objectifs de cette thèse étaient de mettre en évidence les régulations permettant la localisation de BubR1 au tether, ainsi que le rôle de celui-ci dans le cadre de cette structure.

a) La régulation des acteurs du tether

i. L'interaction BubR1-Bub3 et le rôle de Bub3

Nous avons donc montré que l'interaction BubR1-Bub3, via le Bub3-BD de BubR1, est nécessaire à la localisation de BubR1 au tether. En faisant cette démonstration, nous avons également montré que Bub3 se localise au tether, que cette localisation dépend aussi de l'interaction BubR1-Bub3, et qu'il est nécessaire à la stabilité du tether. Ceci présente une certaine analogie avec ce qui a déjà été observé au kinétochore, notamment chez le xénope, concernant la dépendance réciproque de BubR1 et de Bub3 pour leur localisation (Chen, 2002).

Il serait également intéressant de déterminer le rôle de Bub3 au tether, afin de définir si il ne consiste qu'à cibler BubR1 sur celui-ci ou si Bub3 a un rôle plus complexe dans cette structure. On pourrait ainsi imaginer créer une fusion de BubR1 avec une autre protéine se localisant au tether (les domaines précis de localisation au tether n'ayant pas été déterminés), comme INCENP, Aurora B ou Polo (Royou et al., 2010) et observer si cette construction peut sauver le phénotype lié à une absence de Bub3 au tether. On pourrait aussi imaginer, pour obtenir le même résultat, de fusionner le motif de Bub3 interagissant avec le Bub3-BD de BubR1 à une autre protéine, se localisant au tether.

ii. Autres interactants au tether

Nous ne savons par contre pas comment ce complexe y est recruté. En effet, nous avons testé la localisation au tether des protéines connues comme interagissant avec Bub3 au kinétochore, comme Spc105 (Shepperd et al., 2012), Mis12, et les autres protéines du complexe KMN, ainsi que Mad1 et Mps1, qui est connu pour interagir avec BubR1 (Conde et al., 2013) sans succès. La régulation du complexe BubR1-Bub3 au tether est donc significativement différente de celle observée au kinétochore.

Au vu de cette absence de résultats sur une approche ciblée par candidats, il est donc maintenant intéressant d'utiliser de nouvelles approches. Par exemple, il est possible de rechercher des interactants potentiels *in silico* en recherchant dans la séquence de ces deux protéines des sites consensus connus qui seraient liés par d'autres protéines, qui deviendraient alors autant de candidats potentiels pour le recrutement du complexe au tether. Il est aussi possible de mener une approche de type pull-down, en utilisant BubR1 et Bub3 comme sondes. Ceci pourrait permettre de mettre en évidence d'autres partenaires du complexe BubR1-Bub3, dont potentiellement ceux nécessaires à sa localisation au tether, par une approche sans *a priori*. Une telle approche est d'ailleurs en cours au laboratoire. On pourrait s'attendre à retrouver des protéines connues dans la réparation des cassures double brin, et en particulier celles se situant au début de la cascade de signalisation des cassures, comme RPA, d'après ce qui a été montré sur la dynamique des systèmes de réparation des cassures double brin en mitose en cellules humaines (Orthwein et al., 2014).

iii. Généralisation à un autre modèle

De plus, une autre perspective d'intérêt serait de généraliser notre modèle à d'autres organismes, en particulier aux cellules humaines, pour éviter l'écueil de caractériser un mécanisme qui serait spécifique à la drosophile. C'est également une approche qui est en cours au laboratoire, où les protéines intervenant au tether chez la drosophile ont été étiquetées avec un fluorophore et transfectées en cellules humaines. De la laser ablation pour casser des chromosomes en mitose a également été réalisée.

iv. Dynamique de BubR1 au tether

Un autre aspect de la régulation de BubR1 qu'il serait intéressant d'explorer est sa dynamique de localisation au tether. En effet, si il a été mis en évidence que BubR1 se localise au tether en début de mitose, comme il le fait sur les kinétochores, et que, contrairement à son comportement au kinétochore, il persiste en anaphase sur le tether (Royou et al., 2010, Derive et al. en préparation), on ne connaît pas l'origine de ce pool de BubR1 au tether, ni sa dynamique. Là encore, ceci contraste avec le kinétochore où la dynamique de BubR1 est connue (Buffin et al., 2005).

Pour répondre en partie à cette interrogation, nous avons conçu une construction BubR1 étiquetée avec le fluorophore Dendra2, qui est une protéine photoconvertible. En photoconvertissant spécifiquement BubR1 dans certaines zones de la cellule, on pourrait ainsi observer la dynamique de BubR1. Cette approche conduirait, en photoconvertissant le pool de BubR1 au tether, à déterminer si BubR1 y est persistant ou, comme observé dans le MCC quand le SAC est activé, renouvelé en permanence (King et al., 2007a; Mansfeld et al., 2011; Musacchio and Ciliberto, 2012; Nilsson et al., 2008). En photoconvertissant BubR1 aux kinétochores, on pourrait également déterminer si le pool initial de BubR1 au tether provient du kinétochore ou du cytoplasme. Des avancées peuvent donc être menées rapidement sur ce sujet.

v. Rôle de la phosphorylation du domaine KARD de BubR1

Des expériences pourraient également être menées pour étudier le rôle éventuel d'autres domaines sur la fonction de BubR1 au tether. En effet, nous avons mis en évidence l'importance des domaines KEN, KAN et Bub3-BD au tether, mais cela n'exclut pas que d'autres domaines soient importants pour la régulation de BubR1 au tether. Nous n'avons notamment pu étudier que partiellement le rôle du domaine KARD au tether. En effet, les constructions portant la mutation KARD->A (le non-phosphorylable où les 3 positions de phosphorylation sont remplacées par des alanines) ne nous ont pas permis d'obtenir de larves de troisième stade pour étudier ce mutant en fond *BubR1* nul. Nous n'avons donc pas pu observer si la construction entraînait une dynamique de BubR1 différente dans ces conditions, et si elle altérait la fonction du tether dans la ségrégation correcte des acentriques. Il faudrait donc voir si ce problème est lié à une toxicité de la construction. Dans ce cas on pourrait imaginer l'étudier en utilisant un autre promoteur que le promoteur ubiquitine, comme un promoteur inductible. Un promoteur choc thermique, permettant l'induction de l'expression en même temps que I-CreI pourrait être utilisé, en espérant que la quantité de BubR1 produite ainsi soit suffisante pour observer son rôle. Un promoteur organe spécifique pourrait également être utilisé, qui permettrait également l'expression de la construction à partir d'un certain stade de développement, et limiterait ainsi la toxicité éventuelle de la construction sur la viabilité de la larve. Cette non obtention de larves pourrait aussi être due au simple fait que les insertions

aléatoires qui ont été réalisées pour obtenir les stocks de drosophile n'ont eu lieu que dans des régions du génome où celles-ci ont été délétères. Nous avons maintenant au laboratoire des plasmides permettant de faire de l'insertion dirigée dans le génome par la méthode Phic-31, et obtenir ainsi des constructions ayant un niveau d'expression similaire lorsqu'elles sont sous un promoteur identique.

Une autre approche serait d'observer la localisation cellulaire du partenaire connu de BubR1 interagissant via le domaine KARD, B56alpha (Kruse et al., 2013; Suijkerbuijk et al., 2012a). Plusieurs sous-unités B56 ont été mises en évidence chez la drosophile, comme PP2A-B' (qui est la plus proche de B56alpha), Twins, et Widerborst. Il pourrait être intéressant de réaliser plusieurs constructions étiquetées GFP, et de voir si elles se localisent au tether. Ceci permettrait de confirmer si une étude plus complète du domaine KARD serait utile ou non. De plus, il serait intéressant de compléter les études des mutants de délétion présentés dans la publication en réalisant des statistiques des types (égal, anormal) et temps de ségrégation des chromosomes cassés, sur le même modèle que ce qui a été réalisé sur les mutants ponctuels, afin de confirmer les résultats obtenus et surtout d'avoir couvert l'intégralité de la séquence de BubR1 lors de cette étude.

vi. Rôle de l'acétylation de BubR1 au tether

Ensuite, il faudrait étudier si, comme en cellules de mammifères (Choi et al., 2009; Park et al., 2013; Yang et al., 2011, 2012) BubR1 est acétylé en début de mitose par PCAF (dont l'orthologue est Gcn5 chez la drosophile, et est impliqué dans le remodelage des nucléosomes, Suganuma et al., 2008). Il a à ce moment un rôle de pseudo-substrat de l'APC/C-Cdc20 et permet ainsi de l'inhiber dans le cadre du MCC, puis il est déacétylé et sumoylé en début d'anaphase chez la drosophile. Cette déacétylation/sumoylation le transformant en substrat potentiel de l'APC/C-Cdc20 et le conduirait alors à sa dégradation. En particulier si cette hypothèse est vérifiée elle conduirait à supposer que cette déacétylation serait inhibée au niveau du tether, pour y conserver BubR1 actif. En cellules humaines, ce comportement de BubR1 a été étudié grâce à un anticorps spécifique de BubR1 acétylé, et par spectrométrie de masse. On pourrait ici mener plusieurs approches pour étudier un rôle éventuel de l'acétylation de BubR1 au tether. On pourrait commencer par mesurer, par quantification de fluorescence, la persistance de BubR1 et d'une sonde synthétique de l'activité de

l'APC/C (telle que celle que nous avons utilisée) au tether dans un mutant Gcn5. Si celles-ci sont altérées par rapport au sauvage, on pourra alors supposer que l'acétylation de BubR1 puisse avoir un rôle sur BubR1 au tether. Un stock mutant Gcn5 est déjà disponible, et permettrait de commencer rapidement l'expérience. Une approche complémentaire pourrait être aussi de muter la position homologue dans BubR1 du K250 qui est acétylé de manière à empêcher celle-ci, puis d'observer la persistance de BubR1 et de la sonde de façon similaire. Il serait également possible, pour approfondir cette étude, de développer un anticorps anti-BubR1 acétylé, sur le modèle de celui qui a été fait sur cellules humaines. Il permettrait d'étudier la localisation de BubR1 acétylé sur cellules fixées et de confirmer que BubR1 est effectivement acétylé au niveau du tether. Pour ce qui est de l'étude de la sumoylation possible de BubR1, on pourrait étudier, sur cellules fixées avec un anticorps anti-SUMO (existant chez la drosophile), si le marquage ainsi obtenu colocalise avec celui de BubR1. Cette approche est différente de l'approche de *pull-down* utilisée en cellules humaines (Yang et al., 2011), mais est plus adaptée à une étude spécifique de BubR1 au tether, plutôt qu'une étude globale au niveau cellulaire. Cela pourrait permettre de comparer l'état de sumoylation de BubR1 au kinétochore par rapport au tether et ainsi mettre en évidence un des mécanismes de régulation de BubR1 spécifique au tether.

b) Le rôle de BubR1 au tether

Nos résultats indiquent que BubR1 aurait pour rôle au tether de recruter Fzy/Cdc20, *via* son domaine KEN, afin de l'inhiber localement et ainsi protéger un substrat de l'APC/C qui aurait un rôle clé dans la maintenance du tether. Ce modèle se base sur le comportement de BubR1 tel qu'il a été observé au kinétochore (Lara-Gonzalez et al., 2011). Pour renforcer ces résultats, il serait judicieux de confirmer le rôle du domaine KEN en étudiant des mutants de Fzy pour le site de reconnaissance des motifs KEN. Ces mutants ont été caractérisés sur cellules humaines, où il a été mis en évidence par analyse structurale et par analyse de liaison en *pull-down* du complexe Cdc20-BubR1 les sites d'interaction de Cdc20 et ces substrats (Tian et al., 2012). L'étude de la perte de la localisation de Fzy au tether est actuellement un travail en cours au laboratoire, à partir de mutants que nous avons conçus en se basant

sur des alignements de séquence, à partir des données obtenues sur cellules humaines. Nous avons complété cette approche en étudiant également des mutants du motif d'interaction avec Mad2 (et qui devraient donc être résistants à l'inhibition locale de l'APC/C exercée par BubR1 au tether). Ce motif a été mis en évidence chez la levure, dans des mutants qui sont résistants à l'induction du SAC (Hwang et al., 1998). Nous avons également observé des mutants du motif de reconnaissance des D-box, qui sont un des deux motifs, avec le motif KEN, à être reconnus sur les cibles du complexe APC/C-Cdc20 (Tian et al., 2012). Ce dernier mutant pourrait conduire à une stabilisation de la cible au tether, et du substrat synthétique GFP-CycBNt-Bub3 que nous avons conçu et qui est décrit dans notre publication.

L'identification du substrat de l'APC/C qui serait stabilisé au tether est également un enjeu d'importance, vu que cela permettrait, si sa stabilisation est confirmée, de valider que notre hypothèse correspond à une situation physiologique. Pour cela, il faudrait discriminer les substrats possibles au tether, parmi la liste des substrats de l'APC/C-Cdc20 déjà caractérisés dans la littérature. La liste la plus récente et complète a ce sujet a été réalisée à partir des substrats en cellules de mammifères et humaines (voir Annexe 2). En comparant cette liste avec une liste de protéines issues d'un pull-down de BubR1 ou de Bub3, cette discrimination des substrats possiblement au tether serait possible. Cette expérience devra être menée dans des conditions où des tethers seront présents dans un grand nombre de cellules, qui seront donc en mitose, par exemple sur des embryons où I-CreI aura été induite pour générer des cassures. Une autre possibilité est de réaliser une approche prédictive *in silico*, en se basant sur les séquences des substrats déjà connus et les motifs de reconnaissance du complexe, pour identifier parmi les protéines connues chez la drosophile les cibles éventuelles de l'APC/C non encore identifiées. Une fois ces substrats listés, il serait possible de les discriminer en fonction des interactions connues de ceux-ci avec l'ADN ou d'autres protéines connues comme se localisant au tether, pour limiter la liste de candidats à traiter. On pourrait ensuite, après sélection des meilleurs candidats, réaliser des fusions de ces protéines avec une étiquette fluorescente afin de déterminer, en contexte sauvage ou de mutants Fzy ou BubR1 si ce substrat a une dynamique similaire à celle observée pour notre sonde GFP-CycBNt-Bub3, auquel cas nous aurions vraisemblablement trouvé notre substrat d'intérêt.

c) Mus309 et la recherche du mécanisme de réparation des cassures induites par I-CreI

Le résultat concernant Mus309, une hélicase de la famille RecQ impliquée dans la résolution des jonctions de Holliday dans la recombinaison homologue (Hickson, 2003; Weinert and Rio, 2007), et le fait que sa mutation occasionne une létalité lors de l'induction de cassures double brin avec I-CreI est également prometteur. En effet, le taux de survie à l'issue de l'induction d'I-CreI, qui provoque des cassures dans la quasi-totalité des cellules (Royou et al., 2010) indique clairement que ces cassures sont réparées, après que le tether ait permis la ségrégation correcte des fragments cassés en mitose. Cela implique qu'un mécanisme de réparation des cassures soit à l'œuvre. Ainsi, Mus309 serait impliqué dans un mécanisme qui participe à cette réparation. Cependant, il faudrait vérifier cette hypothèse de Mus309 impliqué dans un mécanisme de réparation des cassures.

Ceci peut être mis en œuvre de différentes manières, comme par exemple de générer une construction Mus309 étiquetée GFP et d'observer si celle-ci se localise au site des cassures. Cette démarche a été entreprise au laboratoire et n'a malheureusement pas permis d'observer Mus309 aux cassures, ce qui ne nous permet pas non plus d'infirmer que Mus309 n'y intervient pas. Une autre possibilité serait de confirmer les résultats des tests de létalité en utilisant un mutant d'une des autres protéines intervenant dans la recombinaison homologue. Nous avons essayé cette approche, notamment avec des mutants défectifs pour la réparation de l'ADN. Nous avons testé deux mutants de BRCA2, qui permet le recrutement de certains acteurs de la recombinaison homologue et la protection des cassures par RPA (Esashi et al., 2005). Cependant, aucun des mutants que nous avons testés n'était viable homozygote avec le transgène I-CreI, condition requise pour pouvoir tester la létalité selon notre protocole.

Une autre possibilité serait d'étudier si d'autres protéines intervenant dans la recombinaison homologue (comme Rad51 (Spn-A), l'exonucléase 1 (Tosca), Mus81 ou Emel (Mms4)) se localisent aux cassures. En effet, cela renforcerait notre

hypothèse selon laquelle le mécanisme de réparation impliqué serait effectivement celui-ci.

2) Conclusion générale

Nous avons mis en évidence dans le cadre de cette thèse que BubR1 est recrutée au tether par l'intermédiaire de son interaction avec Bub3 via son *Bub3 Binding Domain*, et que le résidu E481 de BubR1 est nécessaire, chez la drosophile, à cette interaction.

Nous avons également observé que BubR1 recrute, par l'intermédiaire de ses domaines KEN, KAN et KD, Fzy/Cdc20 au tether, et que ces domaines sont importants pour la ségrégation correcte des chromosomes acentriques.

Nous avons enfin montré que BubR1 entraîne une inhibition locale de l'APC/C en anaphase.

Pris ensemble, ces résultats suggèrent un modèle où Bub3 et BubR1 interagissent ensemble pour se localiser sur les chromosomes cassés en mitose, où BubR1 va recruter Fzy, pour entraîner une inhibition locale de l'APC/C-Cdc20. Cette inhibition locale permettrait de protéger un substrat de l'APC/C qui serait capital pour préserver l'intégrité du tether, qu'il reste à identifier.

Annexes

<i>Homo sapiens</i>	<i>Drosophila melanogaster</i>
Apoptosis inhibitor survivin	Deterin
ATR-interacting protein (ATRIP)	ATR-interacting protein mus304
Cell division cycle protein 20 homolog	Fizzy
Centromere protein E	CENP-meta
Dual specificity protein kinase TTK (MPS1)	Altered disjunction
Early mitotic inhibitor 1 / F-box only protein 5	Regulator of cyclin A1 (Rca1)
Histone acetyltransferase KAT2B (P/CAF)	GCN5
Histone H2A.X	Histone H2A.v / H2A.Z
Histone H3-like centromeric protein A (CENP-A)	Centromere identifier protein (Cid)
Kinesin-like protein KIF2C (MCAK)	Kinesin-like protein Klp10A
Kinetochore-associated protein 1	Rough deal (Rod)
LIM domain-containing protein ajuba	LIM domain-containing protein jub
Mitotic checkpoint serine/threonine-protein kinase BUB1 beta	Bub1-related kinase
NAD-dependent protein deacetylase sirtuin-2	NAD-dependent protein deacetylase Sirt2
Protein CASC5 / Kinetochore-null protein 1	Spc105-related
Ras-specific nucleotide exchange factor CDC25	M-phase inducer phosphatase
Securin	Pimples protein
Separin	Separase
Serine/threonine-protein kinase PLK1	Serine/threonine-protein kinase polo
Shugoshin-like 1	Shugoshin
X-ray repair cross-complementing protein 5 (XRCC5)	Ku80
X-ray repair cross-complementing protein 6 (XRCC6)	ATP-dependent DNA helicase 2 subunit 1 (Irbp)

Annexe 1 : Liste des protéines citées dans la thèse ayant un orthologue nommé différemment chez la drosophile.

Substrats	Identifiant UniProt	Nom du gène
Anillin	Q9NQW6	ANLN
Aurora A	O14965	AURKA
Aurora B	Q96GD4	AURKB
B99	Q9NYZ3	GTSE1
BARD1	Q99728	BARD1
Bub1	O43683	BUB1
Cdc6	Q99741	CDC6
Cdc20	Q12834	CDC20
Cdh1	Q9UM11	FZR
CDR2	Q01850	CDR2
CENPF	P49454	CENPF
Cdc25	P30304	CDC25A/CDC25A
Cdt1	Q9H211	CDT1
CKAP2	Q8WWK9	CKAP2
Cks1	P61024	CKS1B
Claspin	Q9HAW4	CLSPN
Cyclin A	P20248	CCNA2
Cyclin B	P14635	CCNB1
E2-C	O00762	UBE2C
FoxM1	Q08050	FoxM1
Geminin	O75496	GMNN
Glutaminase 1	O94925	GLS
Hec1	O14777	NDC80
Hmmr	O75330	HMMR
HSF2	Q03933	HSF2
HURP	Q15398	DLGAP5
Id2	Q02363	ID2
JNK1	P45983	MAPK8
JNK2	P45984	MAPK9
Kid	Q14807	KIF22
Nek2a	P51955	NEK2
Nlp	Q9Y2I6	NINL
NuSAP	Q9BXS6	NUSAP1
p21	P38936	CDKN1A
Pfkfb3	Q16875	PFKFB3
PIF	Q9H611	PIF1
Plk1	P53350	PLK1
Rcs1	Q9BSJ6	FAM64A
Securin	Q5FBB7	PTTG2
Sgo1	Q5FBB7	SGOL1

Skp2	Q13309	SKP2
SnoN	P12757	SKIL
Sororin	Q96FF9	CDCA5
TK1	P04183	TK1
TMPK	P23919	DTYMP
Tome-1	Q99618	CDCA3
TRB3	Q96RU7	TRIB3
TPX2	Q9ULW0	TPX2
PAF	Q15004	PAF
RASSF1A	Q9NS23	RASSF1A
Cyclin B3	Q8WWL7	CCNB3
p190RhoGAP	Q9NRY4	ARHGAP35
Ect2	Q9H8V3	ECT2
USP1	O94782	USP1/USP1
USP37	Q86T82	USP37
Drp1	O00429	DNM1L
p63	Q9H3D4	TP63
centrin	O15182	CETN3
E2F1	Q01094	E2F1
E2F3	O00716	E2F3
Mcl1	Q07820	MCL1
MOAP-1	Q96BY2	MOAP1
OPA1	O60313	OPA1
TFAM	Q00059	TFAM
MFN1	Q8IWA4	MFN1
Receptor-associated protein 80	Q96RL1	UIMC1
Mps1	P33981	TTK
NIPA	Q86WB0	ZC3HC1
G9a	Q96KQ7	EHMT2
GLP	Q96KQ7	EHMT1
Sp100	P23497	SP100
Oct1	P14859	POU2F1

Annexe 2 : Liste des substrats connus de l'APC/C en cellules humaines et de mammifères (d'après Meyer and Rape, 2011; Min et al., 2013)

Références bibliographiques

Abdu, U., Klovstad, M., Butin-Israeli, V., Bakhrat, A., and Schüpbach, T. (2007). An essential role for *Drosophila* hus1 in somatic and meiotic DNA damage responses. *J. Cell Sci.* 120, 1042–1049.

Aboussekhra, A., Vialard, J.E., Morrison, D.E., Torre-Ruiz, M.A. de la, Cernáková, L., Fabre, F., and Lowndes, N.F. (1996). A novel role for the budding yeast RAD9 checkpoint gene in DNA damage-dependent transcription. *EMBO J.* 15, 3912.

Abraham, J., Lemmers, B., Hande, M.P., Moynahan, M.E., Chahwan, C., Ciccio, A., Essers, J., Hanada, K., Chahwan, R., Khaw, A.K., et al. (2003). Eme1 is involved in DNA damage processing and maintenance of genomic stability in mammalian cells. *EMBO J.* 22, 6137–6147.

Allshire, R.C., and Karpen, G.H. (2008). Epigenetic regulation of centromeric chromatin: old dogs, new tricks? *Nat. Rev. Genet.* 9, 923–937.

Almeida, K.H., and Sobol, R.W. (2007). A unified view of base excision repair: Lesion-dependent protein complexes regulated by post-translational modification. *DNA Repair* 6, 695–711.

Alvarez-Fernández, M., Halim, V.A., Krenning, L., Aprelia, M., Mohammed, S., Heck, A.J., and Medema, R.H. (2010). Recovery from a DNA-damage-induced G2 arrest requires Cdk-dependent activation of FoxM1. *EMBO Rep.* 11, 452–458.

De Antoni, A., Pearson, C.G., Cimini, D., Canman, J.C., Sala, V., Nezi, L., Mapelli, M., Sironi, L., Faretta, M., Salmon, E.D., et al. (2005). The Mad1/Mad2 complex as a template for Mad2 activation in the spindle assembly checkpoint. *Curr. Biol.* 15, 214–225.

Axton, J.M., Dombrádi, V., Cohen, P.T.W., and Glover, D.M. (1990). One of the protein phosphatase 1 isoenzymes in *Drosophila* is essential for mitosis. *Cell* 63, 33–46.

Baker, D.J., Jeganathan, K.B., Cameron, J.D., Thompson, M., Juneja, S., Kopecka, A., Kumar, R., Jenkins, R.B., de Groen, P.C., Roche, P., et al. (2004). BubR1 insufficiency causes early onset of aging-associated phenotypes and infertility in mice. *Nat. Genet.* 36, 744–749.

Barr, A.R., and Gergely, F. (2007). Aurora-A: the maker and breaker of spindle poles. *J. Cell Sci.* 120, 2987–2996.

Bartek, J., and Lukas, J. (2007). DNA damage checkpoints: from initiation to recovery or adaptation. *Curr. Opin. Cell Biol.* 19, 238–245.

Basto, R., Scaerou, F., Mische, S., Wojcik, E., Lefebvre, C., Gomes, R., Hays, T., and Karess, R. (2004). In Vivo Dynamics of the Rough Deal Checkpoint Protein during *Drosophila* Mitosis. *Curr. Biol.* 14, 56–61.

- Basto, R., Lau, J., Vinogradova, T., Gardiol, A., Woods, C.G., Khodjakov, A., and Raff, J.W. (2006). Flies without centrioles. *Cell* 125, 1375–1386.
- Basu, J., Bousbaa, H., Logarinho, E., Li, Z., Williams, B.C., Lopes, C., Sunkel, C.E., and Goldberg, M.L. (1999). Mutations in the Essential Spindle Checkpoint Gene Bub1 Cause Chromosome Missegregation and Fail to Block Apoptosis in *Drosophila*. *J. Cell Biol.* 146, 13–28.
- Baumann, C., Körner, R., Hofmann, K., and Nigg, E.A. (2007). PICH, a centromere-associated SNF2 family ATPase, is regulated by Plk1 and required for the spindle checkpoint. *Cell* 128, 101–114.
- Bekker-Jensen, S., Lukas, C., Melander, F., Bartek, J., and Lukas, J. (2005). Dynamic assembly and sustained retention of 53BP1 at the sites of DNA damage are controlled by Mdc1/NFBD1. *J. Cell Biol.* 170, 201–211.
- Berdnik, D., and Knoblich, J.A. (2002). *Drosophila* Aurora-A Is Required for Centrosome Maturation and Actin-Dependent Asymmetric Protein Localization during Mitosis. *Curr. Biol.* 12, 640–647.
- Biebricher, A., Hirano, S., Enzlin, J.H., Wiechens, N., Streicher, W.W., Huttner, D., Wang, L.H.-C., Nigg, E.A., Owen-Hughes, T., Liu, Y., et al. (2013). PICH: A DNA Translocase Specially Adapted for Processing Anaphase Bridge DNA. *Mol. Cell* 51, 691–701.
- Biggins, S., Severin, F.F., Bhalla, N., Sassoon, I., Hyman, A.A., and Murray, A.W. (1999). The conserved protein kinase Ipl1 regulates microtubule binding to kinetochores in budding yeast. *Genes Dev.* 13, 532–544.
- De Boer, L., Oakes, V., Beamish, H., Giles, N., Stevens, F., Somodevilla-Torres, M., DeSouza, C., and Gabrielli, B. (2008). Cyclin A/cdk2 coordinates centrosomal and nuclear mitotic events. *Oncogene* 27, 4261–4268.
- Bohgaki, M., Bohgaki, T., Ghamrasni, S.E., Srikumar, T., Maire, G., Panier, S., Fradet-Turcotte, A., Stewart, G.S., Raught, B., Hakem, A., et al. (2013). RNF168 ubiquitylates 53BP1 and controls its response to DNA double-strand breaks. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 110, 20982–20987.
- Brinkley, B.R., and Stubblefield, E. (1966). The fine structure of the kinetochore of a mammalian cell in vitro. *Chromosoma* 19, 28–43.
- Brodsky, M.H., Sekelsky, J.J., Tsang, G., Hawley, R.S., and Rubin, G.M. (2000). mus304 encodes a novel DNA damage checkpoint protein required during *Drosophila* development. *Genes Dev.* 14, 666–678.
- Buffin, E., Lefebvre, C., Huang, J., Gagou, M.E., and Karess, R.E. (2005). Recruitment of Mad2 to the kinetochore requires the Rod/Zw10 complex. *Curr. Biol.* CB 15, 856–861.
- Buffin, E., Emre, D., and Karess, R.E. (2007). Flies without a spindle checkpoint. *Nat. Cell Biol.* 9, 565–572.

- Bulavin, D.V., Higashimoto, Y., Demidenko, Z.N., Meek, S., Graves, P., Phillips, C., Zhao, H., Moody, S.A., Appella, E., Piwnica-Worms, H., et al. (2003). Dual phosphorylation controls Cdc25 phosphatases and mitotic entry. *Nat. Cell Biol.* 5, 545–551.
- Burma, S., Chen, B.P.C., and Chen, D.J. (2006). Role of non-homologous end joining (NHEJ) in maintaining genomic integrity. *DNA Repair* 5, 1042–1048.
- Burton, J.L., and Solomon, M.J. (2007). Mad3p, a pseudosubstrate inhibitor of APC^{Cdc20} in the spindle assembly checkpoint. *Genes Dev.* 21, 655–667.
- Buschhorn, B.A., Petzold, G., Galova, M., Dube, P., Kraft, C., Herzog, F., Stark, H., and Peters, J.-M. (2011). Substrate binding on the APC/C occurs between the coactivator Cdh1 and the processivity factor Doc1. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 18, 6–13.
- Busino, L., Donzelli, M., Chiesa, M., Guardavaccaro, D., Ganoth, D., Dorrello, N.V., Hershko, A., Pagano, M., and Draetta, G.F. (2003). Degradation of Cdc25A by beta-TrCP during S phase and in response to DNA damage. *Nature* 426, 87–91.
- Caillaud, M.-C., Paganelli, L., Lecomte, P., Deslandes, L., Quentin, M., Pecrix, Y., Le Bris, M., Marfaing, N., Abad, P., and Favery, B. (2009). Spindle Assembly Checkpoint Protein Dynamics Reveal Conserved and Unsuspected Roles in Plant Cell Division. *PLoS ONE* 4, e6757.
- Carney, J.P., Maser, R.S., Olivares, H., Davis, E.M., Le Beau, M., Yates, J.R., Hays, L., Morgan, W.F., and Petrini, J.H. (1998). The hMre11/hRad50 protein complex and Nijmegen breakage syndrome: linkage of double-strand break repair to the cellular DNA damage response. *Cell* 93, 477–486.
- Chan, E.H.Y., Santamaria, A., Silljé, H.H.W., and Nigg, E.A. (2008). Plk1 regulates mitotic Aurora A function through β TrCP-dependent degradation of hBora. *Chromosoma* 117, 457–469.
- Chan, G., Jablonski, S., Sudakin, V., Hittle, J., and Yen, T. (1999). Human BUBR1 is a mitotic checkpoint kinase that monitors CENP-E functions at kinetochores and binds the cyclosome/APC. *J. Cell Biol.* 146, 941–954.
- Chan, G.K.T., Schaar, B.T., and Yen, T.J. (1998). Characterization of the kinetochore binding domain of CENP-E reveals interactions with the kinetochore proteins CENP-F and hBUBR1. *J. Cell Biol.* 143, 49–63.
- Chan, K.-L., North, P.S., and Hickson, I.D. (2007). BLM is required for faithful chromosome segregation and its localization defines a class of ultrafine anaphase bridges. *EMBO J.* 26, 3397–3409.
- Chao, W.C.H., Kulkarni, K., Zhang, Z., Kong, E.H., and Barford, D. (2012). Structure of the mitotic checkpoint complex. *Nature* 484, 208–213.
- Cheeseman, I.M. (2014). The Kinetochore. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 6, a015826.

- Cheeseman, I.M., and Desai, A. (2008). Molecular architecture of the kinetochore-microtubule interface. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 9, 33–46.
- Cheeseman, I.M., Enquist-Newman, M., Müller-Reichert, T., Drubin, D.G., and Barnes, G. (2001). Mitotic Spindle Integrity and Kinetochore Function Linked by the Duo1p/Dam1p Complex. *J. Cell Biol.* 152, 197–212.
- Cheeseman, I.M., Chappie, J.S., Wilson-Kubalek, E.M., and Desai, A. (2006). The Conserved KMN Network Constitutes the Core Microtubule-Binding Site of the Kinetochore. *Cell* 127, 983–997.
- Chen, R.-H. (2002). BubR1 is essential for kinetochore localization of other spindle checkpoint proteins and its phosphorylation requires Mad1. *J. Cell Biol.* 158, 487–496.
- Chen, L., Trujillo, K., Ramos, W., Sung, P., and Tomkinson, A.E. (2001). Promotion of Dnl4-Catalyzed DNA End-Joining by the Rad50/Mre11/Xrs2 and Hdf1/Hdf2 Complexes. *Mol. Cell* 8, 1105–1115.
- Cheng, L., Hunke, L., and Hardy, C.F.J. (1998). Cell Cycle Regulation of the *Saccharomyces cerevisiae* Polo-Like Kinase Cdc5p. *Mol. Cell. Biol.* 18, 7360–7370.
- Choi, E., Choe, H., Min, J., Choi, J.Y., Kim, J., and Lee, H. (2009). BubR1 acetylation at prometaphase is required for modulating APC/C activity and timing of mitosis. *EMBO J.* 28, 2077–2089.
- Choi, E., Park, P.-G., Lee, H., Lee, Y.-K., Kang, G.H., Lee, J.W., Han, W., Lee, H.C., Noh, D.-Y., Lekomtsev, S., et al. (2012). BRCA2 Fine-Tunes the Spindle Assembly Checkpoint through Reinforcement of BubR1 Acetylation. *Dev. Cell* 22, 295–308.
- Chou, Y.-H., Bischoff, J.R., Beach, D., and Goldman, R.D. (1990). Intermediate filament reorganization during mitosis is mediated by p34cdc2 phosphorylation of vimentin. *Cell* 62, 1063–1071.
- Chou, Y.-H., Khuon, S., Herrmann, H., and Goldman, R.D. (2003). Nestin Promotes the Phosphorylation-dependent Disassembly of Vimentin Intermediate Filaments During Mitosis. *Mol. Biol. Cell* 14, 1468–1478.
- Chow, J.P.H., Siu, W.Y., Ho, H.T.B., Ma, K.H.T., Ho, C.C., and Poon, R.Y.C. (2003). Differential contribution of inhibitory phosphorylation of CDC2 and CDK2 for unperturbed cell cycle control and DNA integrity checkpoints. *J. Biol. Chem.* 278, 40815–40828.
- Chowdhury, D., Keogh, M.-C., Ishii, H., Peterson, C.L., Buratowski, S., and Lieberman, J. (2005). γ -H2AX Dephosphorylation by Protein Phosphatase 2A Facilitates DNA Double-Strand Break Repair. *Mol. Cell* 20, 801–809.
- Ciccia, A., and Elledge, S.J. (2010). The DNA damage response: making it safe to play with knives. *Mol. Cell* 40, 179–204.

- Ciccia, A., Constantinou, A., and West, S.C. (2003). Identification and Characterization of the Human Mus81-Eme1 Endonuclease. *J. Biol. Chem.* *278*, 25172–25178.
- Clémenson, C., and Marsolier-Kergoat, M.-C. (2009). DNA damage checkpoint inactivation: adaptation and recovery. *DNA Repair* *8*, 1101–1109.
- Cohen-Fix, O., Peters, J.M., Kirschner, M.W., and Koshland, D. (1996). Anaphase initiation in *Saccharomyces cerevisiae* is controlled by the APC-dependent degradation of the anaphase inhibitor Pds1p. *Genes Dev.* *10*, 3081–3093.
- Collin, P., Nashchekina, O., Walker, R., and Pines, J. (2013). The spindle assembly checkpoint works like a rheostat rather than a toggle switch. *Nat. Cell Biol.* *15*, 1378–1385.
- Collis, S.J., DeWeese, T.L., Jeggo, P.A., and Parker, A.R. (2004). The life and death of DNA-PK. *Oncogene* *24*, 949–961.
- Conde, C., Osswald, M., Barbosa, J., Moutinho-Santos, T., Pinheiro, D., Guimarães, S., Matos, I., Maiato, H., and Sunkel, C.E. (2013). *Drosophila* Polo regulates the spindle assembly checkpoint through Mps1-dependent BubR1 phosphorylation. *EMBO J. advance online publication*.
- Cortez, D., Wang, Y., Qin, J., and Elledge, S.J. (1999). Requirement of ATM-dependent phosphorylation of brca1 in the DNA damage response to double-strand breaks. *Science* *286*, 1162–1166.
- Dalton, W.B., Nandan, M.O., Moore, R.T., and Yang, V.W. (2007). Human Cancer Cells Commonly Acquire DNA Damage during Mitotic Arrest. *Cancer Res.* *67*, 11487–11492.
- Daum, J.R., Potapova, T.A., Sivakumar, S., Daniel, J.J., Flynn, J.N., Rankin, S., and Gorbsky, G.J. (2011). Cohesion fatigue induces chromatid separation in cells delayed at metaphase. *Curr. Biol.* *21*, 1018–1024.
- Davenport, J., Harris, L.D., and Goorha, R. (2006). Spindle checkpoint function requires Mad2-dependent Cdc20 binding to the Mad3 homology domain of BubR1. *Exp. Cell Res.* *312*, 1831–1842.
- Dawson, I.A., Roth, S., and Artavanis-Tsakonas, S. (1995). The *Drosophila* cell cycle gene fuzzy is required for normal degradation of cyclins A and B during mitosis and has homology to the CDC20 gene of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell Biol.* *129*, 725–737.
- Deckbar, D., Birraux, J., Krempler, A., Tchouandong, L., Beucher, A., Walker, S., Stiff, T., Jeggo, P., and Löbrich, M. (2007). Chromosome breakage after G2 checkpoint release. *J. Cell Biol.* *176*, 749–755.
- DeFazio, L.G., Stansel, R.M., Griffith, J.D., and Chu, G. (2002). Synapsis of DNA ends by DNA - dependent protein kinase. *EMBO J.* *21*, 3192–3200.

Dewar, H., Tanaka, K., Nasmyth, K., and Tanaka, T.U. (2004). Tension between two kinetochores suffices for their bi-orientation on the mitotic spindle. *Nature* 428, 93–97.

Dick, A.E., and Gerlich, D.W. (2013). Kinetic framework of spindle assembly checkpoint signalling. *Nat. Cell Biol.* 15, 1370–1377.

Ditchfield, C., Johnson, V.L., Tighe, A., Ellston, R., Haworth, C., Johnson, T., Mortlock, A., Keen, N., and Taylor, S.S. (2003). Aurora B Couples Chromosome Alignment with Anaphase by Targeting BubR1, Mad2, and Cenp-E to Kinetochores. *J. Cell Biol.* 161, 267–280.

Dobles, M., Liberal, V., Scott, M.L., Benezra, R., and Sorger, P.K. (2000). Chromosome Missegregation and Apoptosis in Mice Lacking the Mitotic Checkpoint Protein Mad2. *Cell* 101, 635–645.

Dreyer, W.J., and Bennett, J.C. (1965). The molecular basis of antibody formation: a paradox. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 54, 864–869.

Van Duin, M., de Wit, J., Odijk, H., Westerveld, A., Yasui, A., Koken, M.H., Hoeijmakers, J.H., and Bootsma, D. (1986). Molecular characterization of the human excision repair gene ERCC-1: cDNA cloning and amino acid homology with the yeast DNA repair gene RAD10. *Cell* 44, 913–923.

Dutertre, S., Cazales, M., Quaranta, M., Froment, C., Trabut, V., Dozier, C., Mirey, G., Bouché, J.-P., Theis-Febvre, N., Schmitt, E., et al. (2004). Phosphorylation of CDC25B by Aurora-A at the centrosome contributes to the G2–M transition. *J. Cell Sci.* 117, 2523–2531.

Elia, A.E.H., Cantley, L.C., and Yaffe, M.B. (2003a). Proteomic Screen Finds pSer/pThr-Binding Domain Localizing Plk1 to Mitotic Substrates. *Science* 299, 1228–1231.

Elia, A.E.H., Rellos, P., Haire, L.F., Chao, J.W., Ivins, F.J., Hoepker, K., Mohammad, D., Cantley, L.C., Smerdon, S.J., and Yaffe, M.B. (2003b). The Molecular Basis for Phosphodependent Substrate Targeting and Regulation of Plks by the Polo-Box Domain. *Cell* 115, 83–95.

Elledge, S.J. (1996). Cell Cycle Checkpoints: Preventing an Identity Crisis. *Science* 274, 1664–1672.

Elowe, S., Hümmel, S., Uldschmid, A., Li, X., and Nigg, E.A. (2007). Tension-Sensitive Plk1 Phosphorylation on BubR1 Regulates the Stability of Kinetochores–microtubule Interactions. *Genes Dev.* 21, 2205–2219.

Elowe, S., Dulla, K., Uldschmid, A., Li, X., Dou, Z., and Nigg, E.A. (2010). Uncoupling of the spindle-checkpoint and chromosome-congression functions of BubR1. *J. Cell Sci.* 123, 84–94.

- Esashi, F., Christ, N., Gannon, J., Liu, Y., Hunt, T., Jasin, M., and West, S.C. (2005). CDK-dependent phosphorylation of BRCA2 as a regulatory mechanism for recombinational repair. *Nature* 434, 598–604.
- Espert, A., Uluocak, P., Bastos, R.N., Mangat, D., Graab, P., and Gruneberg, U. (2014). PP2A-B56 opposes Mps1 phosphorylation of Knl1 and thereby promotes spindle assembly checkpoint silencing. *J. Cell Biol.* 206, 833–842.
- Espeut, J., Cheerambathur, D.K., Krenning, L., Oegema, K., and Desai, A. (2012). Microtubule binding by KNL-1 contributes to spindle checkpoint silencing at the kinetochore. *J. Cell Biol.* 196, 469–482.
- Falck, J., Coates, J., and Jackson, S.P. (2005). Conserved modes of recruitment of ATM, ATR and DNA-PKcs to sites of DNA damage. *Nature* 434, 605–611.
- Fang, G. (2002). Checkpoint Protein BubR1 Acts Synergistically with Mad2 to Inhibit Anaphase-promoting Complex. *Mol. Biol. Cell* 13, 755–766.
- Fang, Y., Liu, T., Wang, X., Yang, Y.-M., Deng, H., Kunicki, J., Traganos, F., Darzynkiewicz, Z., Lu, L., and Dai, W. (2006). BubR1 is involved in regulation of DNA damage responses. *Oncogene* 25, 3598–3605.
- Ferrand, A., Chevrier, V., Chauvin, J.-P., and Birnbaum, D. (2009). Ajuba: a new microtubule-associated protein that interacts with BUBR1 and Aurora B at kinetochores in metaphase. *Biol. Cell* 101, 221–240.
- Foe, I.T., Foster, S.A., Cheung, S.K., DeLuca, S.Z., Morgan, D.O., and Toczyski, D.P. (2011). Ubiquitination of Cdc20 by the APC Occurs through an Intramolecular Mechanism. *Curr. Biol.* 21, 1870–1877.
- Da Fonseca, P.C.A., Kong, E.H., Zhang, Z., Schreiber, A., Williams, M.A., Morris, E.P., and Barford, D. (2011). Structures of APC/CCdh1 with substrates identify Cdh1 and Apc10 as the D-box co-receptor. *Nature* 470, 274–278.
- Foster, S.A., and Morgan, D.O. (2012). The APC/C Subunit Mnd2/Apc15 Promotes Cdc20 Autoubiquitination and Spindle Assembly Checkpoint Inactivation. *Mol. Cell* 47, 921–932.
- Fu, Z., Malureanu, L., Huang, J., Wang, W., Li, H., van Deursen, J.M., Tindall, D.J., and Chen, J. (2008). Plk1-dependent phosphorylation of FoxM1 regulates a transcriptional programme required for mitotic progression. *Nat. Cell Biol.* 10, 1076–1082.
- Fujimoto, H., Onishi, N., Kato, N., Takekawa, M., Xu, X.Z., Kosugi, A., Kondo, T., Imamura, M., Oishi, I., Yoda, A., et al. (2005). Regulation of the antioncogenic Chk2 kinase by the oncogenic Wip1 phosphatase. *Cell Death Differ.* 13, 1170–1180.
- Funabiki, H., Yamano, H., Kumada, K., Nagao, K., Hunt, T., and Yanagida, M. (1996). Cut2 proteolysis required for sister-chromatid separation in fission yeast. *Nature* 381, 438–441.

- Fung, T.K., and Poon, R.Y.C. (2005). A roller coaster ride with the mitotic cyclins. *Semin. Cell Dev. Biol.* *16*, 335–342.
- Fung, T.K., Ma, H.T., and Poon, R.Y.C. (2007). Specialized Roles of the Two Mitotic Cyclins in Somatic Cells: Cyclin A as an Activator of M Phase-promoting Factor. *Mol. Biol. Cell* *18*, 1861–1873.
- Galgoczy, D.J., and Toczyski, D.P. (2001). Checkpoint adaptation precedes spontaneous and damage-induced genomic instability in yeast. *Mol. Cell. Biol.* *21*, 1710–1718.
- Ganem, N.J., and Pellman, D. (2012). Linking abnormal mitosis to the acquisition of DNA damage. *J. Cell Biol.* *199*, 871–881.
- Gassmann, R., Holland, A.J., Varma, D., Wan, X., Çivril, F., Cleveland, D.W., Oegema, K., Salmon, E.D., and Desai, A. (2010). Removal of Spindly from microtubule-attached kinetochores controls spindle checkpoint silencing in human cells. *Genes Dev.* *24*, 957–971.
- Gautier, J., Norbury, C., Lohka, M., Nurse, P., and Maller, J. (1988). Purified maturation-promoting factor contains the product of a *Xenopus* homolog of the fission yeast cell cycle control gene *cdc2+*. *Cell* *54*, 433–439.
- Gautier, J., Minshull, J., Lohka, M., Glotzer, M., Hunt, T., and Maller, J.L. (1990). Cyclin is a component of maturation-promoting factor from *Xenopus*. *Cell* *60*, 487–494.
- Ge, S., Skaar, J.R., and Pagano, M. (2009). APC/C- and Mad2-mediated degradation of Cdc20 during spindle checkpoint activation. *Cell Cycle Georget. Tex* *8*, 167–171.
- Van Gent, D.C., and van der Burg, M. (2007). Non-homologous end-joining, a sticky affair. *Oncogene* *26*, 7731–7740.
- Gerlich, D., Koch, B., Dupeux, F., Peters, J.-M., and Ellenberg, J. (2006). Live-cell imaging reveals a stable cohesin-chromatin interaction after but not before DNA replication. *Curr. Biol.* *16*, 1571–1578.
- Giet, R., McLean, D., Descamps, S., Lee, M.J., Raff, J.W., Prigent, C., and Glover, D.M. (2002). *Drosophila* Aurora A kinase is required to localize D-TACC to centrosomes and to regulate astral microtubules. *J. Cell Biol.* *156*, 437–451.
- Gillet, L.C.J., and Schäfer, O.D. (2006). Molecular Mechanisms of Mammalian Global Genome Nucleotide Excision Repair. *Chem. Rev.* *106*, 253–276.
- Giunta, S., and Jackson, S.P. (2011). Give me a break, but not in mitosis: the mitotic DNA damage response marks DNA double-strand breaks with early signaling events. *Cell Cycle Georget. Tex* *10*, 1215–1221.
- Giunta, S., Belotserkovskaya, R., and Jackson, S.P. (2010). DNA damage signaling in response to double-strand breaks during mitosis. *J. Cell Biol.* *190*, 197–207.

- Glotzer, M., Murray, A.W., and Kirschner, M.W. (1991). Cyclin is degraded by the ubiquitin pathway. *Nature* **349**, 132–138.
- Gomez-Godinez, V., Wu, T., Sherman, A.J., Lee, C.S., Liaw, L.-H., Zhongsheng, Y., Yokomori, K., and Berns, M.W. (2010). Analysis of DNA double-strand break response and chromatin structure in mitosis using laser microirradiation. *Nucleic Acids Res.* **38**, e202.
- Gong, D., Pomerening, J.R., Myers, J.W., Gustavsson, C., Jones, J.T., Hahn, A.T., Meyer, T., and Ferrell Jr., J.E. (2007). Cyclin A2 Regulates Nuclear-Envelope Breakdown and the Nuclear Accumulation of Cyclin B1. *Curr. Biol.* **17**, 85–91.
- Gorski, M.M., Eeken, J.C.J., de Jong, A.W.M., Klink, I., Loos, M., Romeijn, R.J., van Veen, B.L., Mullenders, L.H., Ferro, W., and Pastink, A. (2003). The *Drosophila melanogaster* DNA Ligase IV gene plays a crucial role in the repair of radiation-induced DNA double-strand breaks and acts synergistically with Rad54. *Genetics* **165**, 1929–1941.
- Greenberg, R.A., Sobhian, B., Pathania, S., Cantor, S.B., Nakatani, Y., and Livingston, D.M. (2006). Multifactorial contributions to an acute DNA damage response by BRCA1/BARD1-containing complexes. *Genes Dev.* **20**, 34–46.
- Gregan, J., Polakova, S., Zhang, L., Tolić-Nørrelykke, I.M., and Cimini, D. (2011). Merotelic kinetochore attachment: causes and effects. *Trends Cell Biol.* **21**, 374–381.
- Griffis, E.R., Stuurman, N., and Vale, R.D. (2007). Spindly, a novel protein essential for silencing the spindle assembly checkpoint, recruits dynein to the kinetochore. *J. Cell Biol.* **177**, 1005–1015.
- Gruber, S., Haering, C.H., and Nasmyth, K. (2003). Chromosomal Cohesin Forms a Ring. *Cell* **112**, 765–777.
- Le Guezennec, X., and Bulavin, D.V. (2010). WIP1 phosphatase at the crossroads of cancer and aging. *Trends Biochem. Sci.* **35**, 109–114.
- Guirouilh-Barbat, J., Huck, S., Bertrand, P., Pirzio, L., Desmaze, C., Sabatier, L., and Lopez, B.S. (2004). Impact of the KU80 Pathway on NHEJ-Induced Genome Rearrangements in Mammalian Cells. *Mol. Cell* **14**, 611–623.
- Guo, C., Tang, T.-S., and Friedberg, E.C. (2010). SnapShot: Nucleotide Excision Repair. *Cell* **140**, 754–754.e1.
- Guo, Y., Kim, C., Ahmad, S., Zhang, J., and Mao, Y. (2012). CENP-E-dependent BubR1 autophosphorylation enhances chromosome alignment and the mitotic checkpoint. *J. Cell Biol.*
- Ha, G.-H., Baek, K.-H., Kim, H.-S., Jeong, S.-J., Kim, C.-M., McKeon, F., and Lee, C.-W. (2007). p53 Activation in Response to Mitotic Spindle Damage Requires Signaling via BubR1-Mediated Phosphorylation. *Cancer Res.* **67**, 7155–7164.

- Hanahan, D., and Weinberg, R.A. (2011). Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell* 144, 646–674.
- Hanisch, A., Wehner, A., Nigg, E.A., and Silljé, H.H.W. (2006). Different Plk1 Functions Show Distinct Dependencies on Polo-Box Domain-mediated Targeting. *Mol. Biol. Cell* 17, 448–459.
- Hardwick, K.G., Li, R., Mistrot, C., Chen, R.-H., Dann, P., Rudner, A., and Murray, A.W. (1999). Lesions in Many Different Spindle Components Activate the Spindle Checkpoint in the Budding Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 152, 509–518.
- Hardwick, K.G., Johnston, R.C., Smith, D.L., and Murray, A.W. (2000). MAD3 Encodes a Novel Component of the Spindle Checkpoint Which Interacts with Bub3p, Cdc20p, and Mad2p. *J. Cell Biol.* 148, 871–882.
- Harris, L., Davenport, J., Neale, G., and Goorha, R. (2005). The mitotic checkpoint gene BubR1 has two distinct functions in mitosis. *Exp. Cell Res.* 308, 85–100.
- Harrison, J.C., and Haber, J.E. (2006). Surviving the breakup: the DNA damage checkpoint. *Annu. Rev. Genet.* 40, 209–235.
- Hartwell, L.H., and Weinert, T.A. (1989). Checkpoints: controls that ensure the order of cell cycle events. *Science* 246, 629–634.
- Hauf, S., Cole, R.W., LaTerra, S., Zimmer, C., Schnapp, G., Walter, R., Heckel, A., Meel, J. van, Rieder, C.L., and Peters, J.-M. (2003). The small molecule Hesperadin reveals a role for Aurora B in correcting kinetochore–microtubule attachment and in maintaining the spindle assembly checkpoint. *J. Cell Biol.* 161, 281–294.
- Hayashi, M.T., Cesare, A.J., Fitzpatrick, J.A.J., Lazzerini-Denchi, E., and Karlseder, J. (2012). A telomere-dependent DNA damage checkpoint induced by prolonged mitotic arrest. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 19, 387–394.
- He, X., Rines, D.R., Espelin, C.W., and Sorger, P.K. (2001). Molecular analysis of kinetochore-microtubule attachment in budding yeast. *Cell* 106, 195–206.
- Heald, R., and McKeon, F. (1990). Mutations of phosphorylation sites in lamin A that prevent nuclear lamina disassembly in mitosis. *Cell* 61, 579–589.
- Hegde, M.L., Hazra, T.K., and Mitra, S. (2008). Early steps in the DNA base excision/single-strand interruption repair pathway in mammalian cells. *Cell Res.* 18, 27–47.
- Herzog, F., Primorac, I., Dube, P., Lenart, P., Sander, B., Mechtler, K., Stark, H., and Peters, J.-M. (2009). Structure of the Anaphase-Promoting Complex/Cyclosome Interacting with a Mitotic Checkpoint Complex. *Science* 323, 1477–1481.
- Hewitt, L., Tighe, A., Santaguida, S., White, A.M., Jones, C.D., Musacchio, A., Green, S., and Taylor, S.S. (2010). Sustained Mps1 activity is required in mitosis to recruit O-Mad2 to the Mad1–C-Mad2 core complex. *J. Cell Biol.* 190, 25–34.

- Hickson, I.D. (2003). RecQ helicases: caretakers of the genome. *Nat. Rev. Cancer* 3, 169–178.
- Hirao, A., Kong, Y.-Y., Matsuoka, S., Wakeham, A., Ruland, J., Yoshida, H., Liu, D., Elledge, S.J., and Mak, T.W. (2000). DNA Damage-Induced Activation of p53 by the Checkpoint Kinase Chk2. *Science* 287, 1824–1827.
- Hirao, A., Cheung, A., Duncan, G., Girard, P.-M., Elia, A.J., Wakeham, A., Okada, H., Sarkissian, T., Wong, J.A., Sakai, T., et al. (2002). Chk2 Is a Tumor Suppressor That Regulates Apoptosis in both an Ataxia Telangiectasia Mutated (ATM)-Dependent and an ATM-Independent Manner. *Mol. Cell. Biol.* 22, 6521–6532.
- Hoeijmakers, J.H.J. (1993). Nucleotide excision repair II: from yeast to mammals. *Trends Genet.* 9, 211–217.
- Howell, B.J., McEwen, B.F., Canman, J.C., Hoffman, D.B., Farrar, E.M., Rieder, C.L., and Salmon, E.D. (2001). Cytoplasmic dynein/dynactin drives kinetochore protein transport to the spindle poles and has a role in mitotic spindle checkpoint inactivation. *J. Cell Biol.* 155, 1159–1172.
- Howell, B.J., Moree, B., Farrar, E.M., Stewart, S., Fang, G., and Salmon, E.D. (2004). Spindle checkpoint protein dynamics at kinetochores in living cells. *Curr. Biol.* 14, 953–964.
- Hoyt, M.A., Totis, L., and Roberts, B.T. (1991). *S. cerevisiae* genes required for cell cycle arrest in response to loss of microtubule function. *Cell* 66, 507–517.
- Huang, H., Hittle, J., Zappacosta, F., Annan, R.S., Hershko, A., and Yen, T.J. (2008). Phosphorylation sites in BubR1 that regulate kinetochore attachment, tension, and mitotic exit. *J. Cell Biol.* 183, 667–680.
- Hutterer, A., Berdnik, D., Wirtz-Peitz, F., Zigman, M., Schleiffer, A., and Knoblich, J.A. (2006). Mitotic activation of the kinase Aurora-A requires its binding partner Bora. *Dev. Cell* 11, 147–157.
- Hwang, L.H., Lau, L.F., Smith, D.L., Mistrot, C.A., Hardwick, K.G., Hwang, E.S., Amon, A., and Murray, A.W. (1998). Budding yeast Cdc20: a target of the spindle checkpoint. *Science* 279, 1041–1044.
- Hyun, S.-Y., Sarantuya, B., Lee, H.-J., and Jang, Y.-J. (2013). APC/CCdh1-dependent degradation of Cdc20 requires a phosphorylation on CRY-box by Polo-like kinase-1 during somatic cell cycle. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 436, 12–18.
- Indjeian, V.B., Stern, B.M., and Murray, A.W. (2005). The centromeric protein Sgo1 is required to sense lack of tension on mitotic chromosomes. *Science* 307, 130–133.
- Ivanov, E.L., and Haber, J.E. (1995). RAD1 and RAD10, but not other excision repair genes, are required for double-strand break-induced recombination in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 15, 2245–2251.

- Ivanov, E.L., Sugawara, N., Fishman-Lobell, J., and Haber, J.E. (1996). Genetic Requirements for the Single-Strand Annealing Pathway of Double-Strand Break Repair in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* *142*, 693–704.
- Iyer, R.R., Pluciennik, A., Burdett, V., and Modrich, P.L. (2006). DNA Mismatch Repair: Functions and Mechanisms. *Chem. Rev.* *106*, 302–323.
- Izawa, D., and Pines, J. (2012). Mad2 and the APC/C compete for the same site on Cdc20 to ensure proper chromosome segregation. *J. Cell Biol.* *199*, 27–37.
- Jablonski, S.A., Chan, G.K.T., Cooke, C.A., Earnshaw, W.C., and Yen, T.J. (1998). The hBUB1 and hBUBR1 kinases sequentially assemble onto kinetochores during prophase with hBUBR1 concentrating at the kinetochore plates in mitosis. *Chromosoma* *107*, 386–396.
- Jackman, M., Lindon, C., Nigg, E.A., and Pines, J. (2003). Active cyclin B1–Cdk1 first appears on centrosomes in prophase. *Nat. Cell Biol.* *5*, 143–148.
- De Jager, M., van Noort, J., van Gent, D.C., Dekker, C., Kanaar, R., and Wyman, C. (2001). Human Rad50/Mre11 is a flexible complex that can tether DNA ends. *Mol. Cell* *8*, 1129–1135.
- Jaklevic, B.R., and Su, T.T. (2004). Relative Contribution of DNA Repair, Cell Cycle Checkpoints, and Cell Death to Survival after DNA Damage in *Drosophila* Larvae. *Curr. Biol.* *14*, 23–32.
- Janke, C., Ortíz, J., Tanaka, T.U., Lechner, J., and Schiebel, E. (2002). Four new subunits of the Dam1-Duo1 complex reveal novel functions in sister kinetochore biorientation. *EMBO J.* *21*, 181–193.
- Jazayeri, A., Falck, J., Lukas, C., Bartek, J., Smith, G.C.M., Lukas, J., and Jackson, S.P. (2006). ATM- and cell cycle-dependent regulation of ATR in response to DNA double-strand breaks. *Nat. Cell Biol.* *8*, 37–45.
- Jelinsky, S.A., and Samson, L.D. (1999). Global response of *Saccharomyces cerevisiae* to an alkylating agent. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *96*, 1486–1491.
- Jin, J., Shirogane, T., Xu, L., Nalepa, G., Qin, J., Elledge, S.J., and Harper, J.W. (2003). SCF β -TRCP links Chk1 signaling to degradation of the Cdc25A protein phosphatase. *Genes Dev.* *17*, 3062–3074.
- Jiricny, J. (2006). The multifaceted mismatch-repair system. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *7*, 335–346.
- Johnson, V.L., Scott, M.I.F., Holt, S.V., Hussein, D., and Taylor, S.S. (2004). Bub1 is required for kinetochore localization of BubR1, Cenp-E, Cenp-F and Mad2, and chromosome congression. *J. Cell Sci.* *117*, 1577–1589.
- Johnson-Schlitz, D., and Engels, W.R. (2006). Template disruptions and failure of double Holliday junction dissolution during double-strand break repair in *Drosophila* BLM mutants. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *103*, 16840–16845.

- Jones, M.H., He, X., Giddings, T.H., and Winey, M. (2001). Yeast Dam1p has a role at the kinetochore in assembly of the mitotic spindle. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *98*, 13675–13680.
- Jung, D., and Alt, F.W. (2004). Unraveling V(D)J Recombination: Insights into Gene Regulation. *Cell* *116*, 299–311.
- Kanaar, R., Wyman, C., and Rothstein, R. (2008). Quality control of DNA break metabolism: in the “end”, it’s a good thing. *EMBO J.* *27*, 581–588.
- Kanemori, Y., Uto, K., and Sagata, N. (2005). β -TrCP recognizes a previously undescribed nonphosphorylated destruction motif in Cdc25A and Cdc25B phosphatases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *102*, 6279–6284.
- Kappeler, M., Kranz, E., Woolcock, K., Georgiev, O., and Schaffner, W. (2008). *Drosophila* bloom helicase maintains genome integrity by inhibiting recombination between divergent DNA sequences. *Nucleic Acids Res.* *36*, 6907–6917.
- Karess, R. (2005). Rod-Zw10-Zwilch: a key player in the spindle checkpoint. *Trends Cell Biol.* *15*, 386–392.
- Kastan, M.B., and Bartek, J. (2004). Cell-cycle checkpoints and cancer. *Nature* *432*, 316–323.
- Ke, Y., Huh, J.-W., Warrington, R., Li, B., Wu, N., Leng, M., Zhang, J., Ball, H.L., Li, B., and Yu, H. (2011). PICH and BLM limit histone association with anaphase centromeric DNA threads and promote their resolution: PICH and BLM limit histone association. *EMBO J.* *30*, 3309–3321.
- Kim, G.D., Choi, Y.H., Dimtchev, A., Jeong, S.J., Dritschilo, A., and Jung, M. (1999). Sensing of Ionizing Radiation-induced DNA Damage by ATM through Interaction with Histone Deacetylase. *J. Biol. Chem.* *274*, 31127–31130.
- Kim, S., Park, S.-Y., Yong, H., Famulski, J.K., Chae, S., Lee, J.-H., Kang, C.-M., Saya, H., Chan, G.K., and Cho, H. (2008). HBV X protein targets hBubR1, which induces dysregulation of the mitotic checkpoint. *Oncogene* *27*, 3457–3464.
- Kim, S.H., Lin, D.P., Matsumoto, S., Kitazono, A., and Matsumoto, T. (1998). Fission Yeast Slp1: An Effector of the Mad2-Dependent Spindle Checkpoint. *Science* *279*, 1045–1047.
- Kimura, K., Hirano, M., Kobayashi, R., and Hirano, T. (1998). Phosphorylation and Activation of 13S Condensin by Cdc2 in Vitro. *Science* *282*, 487–490.
- King, E.M.J., van der Sar, S.J.A., and Hardwick, K.G. (2007a). Mad3 KEN Boxes Mediate both Cdc20 and Mad3 Turnover, and Are Critical for the Spindle Checkpoint. *PLoS ONE* *2*, e342.
- King, E.M.J., Rachidi, N., Morrice, N., Hardwick, K.G., and Stark, M.J.R. (2007b). Ipl1p-dependent phosphorylation of Mad3p is required for the spindle

checkpoint response to lack of tension at kinetochores. *Genes Dev.* 21, 1163–1168.

Kitajima, T.S., Sakuno, T., Ishiguro, K., Iemura, S., Natsume, T., Kawashima, S.A., and Watanabe, Y. (2006). Shugoshin collaborates with protein phosphatase 2A to protect cohesin. *Nature* 441, 46–52.

Kiyomitsu, T., Obuse, C., and Yanagida, M. (2007). Human Blinkin/AF15q14 Is Required for Chromosome Alignment and the Mitotic Checkpoint through Direct Interaction with Bub1 and BubR1. *Dev. Cell* 13, 663–676.

Klovstad, M., Abdu, U., and Schüpbach, T. (2008). *Drosophila* brca2 is required for mitotic and meiotic DNA repair and efficient activation of the meiotic recombination checkpoint. *PLoS Genet.* 4, e31.

Kops, G.J.P.L., Kim, Y., Weaver, B.A.A., Mao, Y., McLeod, I., Yates, J.R., Tagaya, M., and Cleveland, D.W. (2005). ZW10 links mitotic checkpoint signaling to the structural kinetochore. *J. Cell Biol.* 169, 49–60.

Kozlov, S.V., Graham, M.E., Peng, C., Chen, P., Robinson, P.J., and Lavin, M.F. (2006). Involvement of novel autophosphorylation sites in ATM activation. *EMBO J.* 25, 3504–3514.

Krempler, A., Deckbar, D., Jeggo, P.A., and Löbrich, M. (2007). An imperfect G2M checkpoint contributes to chromosome instability following irradiation of S and G2 phase cells. *Cell Cycle Georget. Tex* 6, 1682–1686.

Kruse, T., Zhang, G., Larsen, M.S.Y., Lischetti, T., Streicher, W., Kragh Nielsen, T., Bjørn, S.P., and Nilsson, J. (2013). Direct binding between BubR1 and B56-PP2A phosphatase complexes regulate mitotic progression. *J. Cell Sci.* 126, 1086–1092.

Kulukian, A., Han, J.S., and Cleveland, D.W. (2009). Unattached Kinetochore Catalyze Production of an Anaphase Inhibitor that Requires a Mad2 Template to Prime Cdc20 for BubR1 Binding. *Dev. Cell* 16, 105–117.

Kunitoku, N., Sasayama, T., Marumoto, T., Zhang, D., Honda, S., Kobayashi, O., Hatakeyama, K., Ushio, Y., Saya, H., and Hirota, T. (2003). CENP-A phosphorylation by Aurora-A in prophase is required for enrichment of Aurora-B at inner centromeres and for kinetochore function. *Dev. Cell* 5, 853–864.

Laat, W.L. de, Jaspers, N.G.J., and Hoeijmakers, J.H.J. (1999). Molecular mechanism of nucleotide excision repair. *Genes Dev.* 13, 768–785.

Lampson, M.A., and Kapoor, T.M. (2005). The human mitotic checkpoint protein BubR1 regulates chromosome–spindle attachments. *Nat. Cell Biol.* 7, 93–98.

Lampson, M.A., Renduchitala, K., Khodjakov, A., and Kapoor, T.M. (2004). Correcting improper chromosome–spindle attachments during cell division. *Nat. Cell Biol.* 6, 232–237.

- Lan, W., Zhang, X., Kline-Smith, S.L., Rosasco, S.E., Barrett-Wilt, G.A., Shabanowitz, J., Hunt, D.F., Walczak, C.E., and Stukenberg, P.T. (2004). Aurora B phosphorylates centromeric MCAK and regulates its localization and microtubule depolymerization activity. *Curr. Biol.* *14*, 273–286.
- Lankenau, D.H. (1995). Genetics of genetics in *Drosophila*: P elements serving the study of homologous recombination, gene conversion and targeting. *Chromosoma* *103*, 659–668.
- Laoukili, J., Kooistra, M.R.H., Brás, A., Kauw, J., Kerkhoven, R.M., Morrison, A., Clevers, H., and Medema, R.H. (2005). FoxM1 is required for execution of the mitotic programme and chromosome stability. *Nat. Cell Biol.* *7*, 126–136.
- Lara-Gonzalez, P., Scott, M.I.F., Diez, M., Sen, O., and Taylor, S.S. (2011). BubR1 blocks substrate recruitment to the APC/C in a KEN-box-dependent manner. *J. Cell Sci.*
- LaRocque, J.R., Jaklevic, B., Su, T.T., and Sekelsky, J. (2006). *Drosophila* ATR in Double-Strand Break Repair. *Genetics* *175*, 1023–1033.
- Larrea, A.A., Lujan, S.A., and Kunkel, T.A. (2010). SnapShot: DNA Mismatch Repair. *Cell* *141*, 730–730.e1.
- Larsen, N.A., Al-Bassam, J., Wei, R.R., and Harrison, S.C. (2007). Structural Analysis of Bub3 Interactions in the Mitotic Spindle Checkpoint. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *104*, 1201–1206.
- Lee, D.-H., Acharya, S.S., Kwon, M., Drane, P., Guan, Y., Adelmant, G., Kalev, P., Shah, J., Pellman, D., Marto, J.A., et al. (2014). Dephosphorylation Enables the Recruitment of 53BP1 to Double-Strand DNA Breaks. *Mol. Cell* *54*, 512–525.
- Lee, M.S., Edwards, R.A., Thede, G.L., and Glover, J.N.M. (2005). Structure of the BRCT repeat domain of MDC1 and its specificity for the free COOH-terminal end of the gamma-H2AX histone tail. *J. Biol. Chem.* *280*, 32053–32056.
- Lee, S.E., Moore, J.K., Holmes, A., Umez, K., Kolodner, R.D., and Haber, J.E. (1998). *Saccharomyces* Ku70, mre11/rad50 and RPA proteins regulate adaptation to G2/M arrest after DNA damage. *Cell* *94*, 399–409.
- Lee, S.E., Pellicioli, A., Vaze, M.B., Sugawara, N., Malkova, A., Foiani, M., and Haber, J.E. (2003). Yeast Rad52 and Rad51 recombination proteins define a second pathway of DNA damage assessment in response to a single double-strand break. *Mol. Cell. Biol.* *23*, 8913–8923.
- Leibeling, D., Laspe, P., and Emmert, S. (2006). Nucleotide excision repair and cancer. *J. Mol. Histol.* *37*, 225–238.
- Lénárt, P., Petronczki, M., Steegmaier, M., Di Fiore, B., Lipp, J.J., Hoffmann, M., Rettig, W.J., Kraut, N., and Peters, J.-M. (2007). The small-molecule inhibitor BI 2536 reveals novel insights into mitotic roles of polo-like kinase 1. *Curr. Biol.* *17*, 304–315.

- Lesage, B., Qian, J., and Bollen, M. (2011). Spindle Checkpoint Silencing: PP1 Tips the Balance. *Curr. Biol.* 21, R898–R903.
- Leung-Pineda, V., Ryan, C.E., and Piwnica-Worms, H. (2006). Phosphorylation of Chk1 by ATR is antagonized by a Chk1-regulated protein phosphatase 2A circuit. *Mol. Cell. Biol.* 26, 7529–7538.
- Li, R., and Murray, A.W. (1991). Feedback control of mitosis in budding yeast. *Cell* 66, 519–531.
- Li, X., and Nicklas, R.B. (1995). Mitotic forces control a cell-cycle checkpoint. *Nature* 373, 630–632.
- Li, M., Fang, X., Wei, Z., York, J.P., and Zhang, P. (2009). Loss of spindle assembly checkpoint-mediated inhibition of Cdc20 promotes tumorigenesis in mice. *J. Cell Biol.* 185, 983–994.
- Li, Y., Bachant, J., Alcasabas, A.A., Wang, Y., Qin, J., and Elledge, S.J. (2002). The mitotic spindle is required for loading of the DASH complex onto the kinetochore. *Genes Dev.* 16, 183–197.
- Limbo, O., Chahwan, C., Yamada, Y., de Bruin, R.A.M., Wittenberg, C., and Russell, P. (2007). Ctp1 is a cell-cycle-regulated protein that functions with Mre11 complex to control double-strand break repair by homologous recombination. *Mol. Cell* 28, 134–146.
- Lindahl, T. (1993). Instability and decay of the primary structure of DNA. *Nature* 362, 709–715.
- Lindqvist, A., van Zon, W., Karlsson Rosenthal, C., and Wolthuis, R.M.F. (2007). Cyclin B1–Cdk1 Activation Continues after Centrosome Separation to Control Mitotic Progression. *PLoS Biol.* 5, e123.
- Lindqvist, A., Rodríguez-Bravo, V., and Medema, R.H. (2009). The decision to enter mitosis: feedback and redundancy in the mitotic entry network. *J. Cell Biol.* 185, 193–202.
- Liu, S., Bekker-Jensen, S., Mailand, N., Lukas, C., Bartek, J., and Lukas, J. (2006). Claspin Operates Downstream of TopBP1 To Direct ATR Signaling towards Chk1 Activation. *Mol. Cell. Biol.* 26, 6056–6064.
- Liu, Y., Masson, J.-Y., Shah, R., O'Regan, P., and West, S.C. (2004). RAD51C Is Required for Holliday Junction Processing in Mammalian Cells. *Science* 303, 243–246.
- Logarinho, E., Bousbaa, H., Dias, J.M., Lopes, C., Amorim, I., Antunes-Martins, A., and Sunkel, C.E. (2004). Different Spindle Checkpoint Proteins Monitor Microtubule Attachment and Tension at Kinetochores in *Drosophila* Cells. *J. Cell Sci.* 117, 1757–1771.

- Lohka, M.J., Hayes, M.K., and Maller, J.L. (1988). Purification of maturation-promoting factor, an intracellular regulator of early mitotic events. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *85*, 3009–3013.
- London, N., and Biggins, S. (2014). Mad1 kinetochore recruitment by Mps1-mediated phosphorylation of Bub1 signals the spindle checkpoint. *Genes Dev.* *28*, 140–152.
- London, N., Ceto, S., Ranish, J.A., and Biggins, S. (2012). Phosphoregulation of Spc105 by Mps1 and PP1 Regulates Bub1 Localization to Kinetochores. *Curr. Biol.* *22*, 900–906.
- Lowery, D.M., Clauser, K.R., Hjerrild, M., Lim, D., Alexander, J., Kishi, K., Ong, S.-E., Gammeltoft, S., Carr, S.A., and Yaffe, M.B. (2007). Proteomic screen defines the Polo - box domain interactome and identifies Rock2 as a Plk1 substrate. *EMBO J.* *26*, 2262–2273.
- Lowndes, N.F., and Murguia, J.R. (2000). Sensing and responding to DNA damage. *Curr. Opin. Genet. Dev.* *10*, 17–25.
- Lu, X., Nguyen, T.-A., and Donehower, L.A. (2005a). Reversal of the ATM/ATR-mediated DNA damage response by the oncogenic phosphatase PPM1D. *Cell Cycle Georget. Tex* *4*, 1060–1064.
- Lu, X., Nannenga, B., and Donehower, L.A. (2005b). PPM1D dephosphorylates Chk1 and p53 and abrogates cell cycle checkpoints. *Genes Dev.* *19*, 1162–1174.
- Lu, X., Nguyen, T.-A., Moon, S.-H., Darlington, Y., Sommer, M., and Donehower, L.A. (2008). The type 2C phosphatase Wip1: an oncogenic regulator of tumor suppressor and DNA damage response pathways. *Cancer Metastasis Rev.* *27*, 123–135.
- Lukas, C., Bartkova, J., Latella, L., Falck, J., Mailand, N., Schroeder, T., Sehested, M., Lukas, J., and Bartek, J. (2001). DNA Damage-activated Kinase Chk2 Is Independent of Proliferation or Differentiation Yet Correlates with Tissue Biology. *Cancer Res.* *61*, 4990–4993.
- Luo, X., Fang, G., Coldiron, M., Lin, Y., Yu, H., Kirschner, M.W., and Wagner, G. (2000). Structure of the Mad2 spindle assembly checkpoint protein and its interaction with Cdc20. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *7*, 224–229.
- Luo, X., Tang, Z., Rizo, J., and Yu, H. (2002). The Mad2 Spindle Checkpoint Protein Undergoes Similar Major Conformational Changes Upon Binding to Either Mad1 or Cdc20. *Mol. Cell* *9*, 59–71.
- Luo, X., Tang, Z., Xia, G., Wassmann, K., Matsumoto, T., Rizo, J., and Yu, H. (2004). The Mad2 spindle checkpoint protein has two distinct natively folded states. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *11*, 338–345.
- Maciejowski, J., George, K.A., Terret, M.-E., Zhang, C., Shokat, K.M., and Jallepalli, P.V. (2010). Mps1 directs the assembly of Cdc20 inhibitory complexes during

interphase and mitosis to control M phase timing and spindle checkpoint signaling. *J. Cell Biol.* **190**, 89–100.

Macûrek, L., Lindqvist, A., Lim, D., Lampson, M.A., Klompmaker, R., Freire, R., Clouin, C., Taylor, S.S., Yaffe, M.B., and Medema, R.H. (2008). Polo-like kinase-1 is activated by aurora A to promote checkpoint recovery. *Nature* **455**, 119–123.

Mailand, N., Bekker-Jensen, S., Bartek, J., and Lukas, J. (2006). Destruction of Claspin by SCF β TrCP restrains Chk1 activation and facilitates recovery from genotoxic stress. *Mol. Cell* **23**, 307–318.

Maldonado, M., and Kapoor, T.M. (2011). Constitutive Mad1 targeting to kinetochores uncouples checkpoint signalling from chromosome biorientation. *Nat. Cell Biol.* **13**, 475–482.

Malone, R.E., and Esposito, R.E. (1980). The RAD52 gene is required for homothallic interconversion of mating types and spontaneous mitotic recombination in yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **77**, 503–507.

Malureanu, L.A., Jeganathan, K.B., Hamada, M., Wasilewski, L., Davenport, J., and van Deursen, J.M. (2009). BubR1 N terminus acts as a soluble inhibitor of cyclin B degradation by APC/C(Cdc20) in interphase. *Dev. Cell* **16**, 118–131.

Mamely, I., van Vugt, M.A., Smits, V.A., Sempole, J.I., Lemmens, B., Perrakis, A., Medema, R.H., and Freire, R. (2006). Polo-like Kinase-1 Controls Proteasome-Dependent Degradation of Claspin during Checkpoint Recovery. *Curr. Biol.* **16**, 1950–1955.

Mansfeld, J., Collin, P., Collins, M.O., Choudhary, J.S., and Pines, J. (2011). APC15 drives the turnover of MCC-CDC20 to make the spindle assembly checkpoint responsive to kinetochore attachment. *Nat. Cell Biol.* **13**, 1234–1243.

Mao, Y., Abrieu, A., and Cleveland, D.W. (2003). Activating and silencing the mitotic checkpoint through CENP-E-dependent activation/inactivation of BubR1. *Cell* **114**, 87–98.

Mapelli, M., and Musacchio, A. (2007). MAD contortions: conformational dimerization boosts spindle checkpoint signaling. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **17**, 716–725.

Mapelli, M., Filipp, F.V., Rancati, G., Massimiliano, L., Nezi, L., Stier, G., Hagan, R.S., Confalonieri, S., Piatti, S., Sattler, M., et al. (2006). Determinants of conformational dimerization of Mad2 and its inhibition by p31comet. *EMBO J.* **25**, 1273–1284.

Mapelli, M., Massimiliano, L., Santaguida, S., and Musacchio, A. (2007). The Mad2 conformational dimer: structure and implications for the spindle assembly checkpoint. *Cell* **131**, 730–743.

- Maresca, T.J., and Salmon, E.D. (2009). Intrakinetochore stretch is associated with changes in kinetochore phosphorylation and spindle assembly checkpoint activity. *J. Cell Biol.* 184, 373–381.
- Martin, S.G., Laroche, T., Suka, N., Grunstein, M., and Gasser, S.M. (1999). Relocalization of Telomeric Ku and SIR Proteins in Response to DNA Strand Breaks in Yeast. *Cell* 97, 621–633.
- Martin-Lluesma, S., Stucke, V.M., and Nigg, E.A. (2002). Role of Hec1 in Spindle Checkpoint Signaling and Kinetochore Recruitment of Mad1/Mad2. *Science* 297, 2267–2270.
- De Massy, B. (2013). Initiation of Meiotic Recombination: How and Where? Conservation and Specificities Among Eukaryotes. *Annu. Rev. Genet.* 47, 563–599.
- Matsumura, S., Toyoshima, F., and Nishida, E. (2007). Polo-like Kinase 1 Facilitates Chromosome Alignment during Prometaphase through BubR1. *J. Biol. Chem.* 282, 15217–15227.
- Matsuoka, S., Rotman, G., Ogawa, A., Shiloh, Y., Tamai, K., and Elledge, S.J. (2000). Ataxia telangiectasia-mutated phosphorylates Chk2 in vivo and in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97, 10389–10394.
- Mayer-Jaekel, R.E., Ohkura, H., Gomes, R., Sunkel, C.E., Baumgartner, S., Hemmings, B.A., and Glover, D.M. (1993). The 55 kd regulatory subunit of *Drosophila* protein phosphatase 2A is required for anaphase. *Cell* 72, 621–633.
- McAinsh, A.D., Scott-Drew, S., Murray, J.A., and Jackson, S.P. (1999). DNA damage triggers disruption of telomeric silencing and Mec1p-dependent relocation of Sir3p. *Curr. Biol. CB* 9, 963–966.
- McClelland, M.L., Gardner, R.D., Kallio, M.J., Daum, J.R., Gorbsky, G.J., Burke, D.J., and Stukenberg, P.T. (2003). The highly conserved Ndc80 complex is required for kinetochore assembly, chromosome congression, and spindle checkpoint activity. *Genes Dev.* 17, 101–114.
- McClintock, B. (1941). The Stability of Broken Ends of Chromosomes in *Zea Mays*. *Genetics* 26, 234–282.
- McClintock, B. (1942). The Fusion of Broken Ends of Chromosomes Following Nuclear Fusion. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 28, 458.
- McIntosh, J.R., Grishchuk, E.L., and West, R.R. (2002). Chromosome-Microtubule Interactions During Mitosis. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 18, 193–219.
- McVey, M., Radut, D., and Sekelsky, J.J. (2004). End-joining repair of double-strand breaks in *Drosophila melanogaster* is largely DNA ligase IV independent. *Genetics* 168, 2067–2076.

- McVey, M., Andersen, S.L., Broze, Y., and Sekelsky, J. (2007). Multiple Functions of *Drosophila* BLM Helicase in Maintenance of Genome Stability. *Genetics* 176, 1979–1992.
- Meadows, J.C., Shepperd, L.A., Vanoosthuyse, V., Lancaster, T.C., Sochaj, A.M., Buttrick, G.J., Hardwick, K.G., and Millar, J.B.A. (2011). Spindle Checkpoint Silencing Requires Association of PP1 to Both Spc7 and Kinesin-8 Motors. *Dev. Cell* 20, 739–750.
- Meraldi, P., Draviam, V.M., and Sorger, P.K. (2004). Timing and Checkpoints in the Regulation of Mitotic Progression. *Dev. Cell* 7, 45–60.
- Meyer, H.-J., and Rape, M. (2011). Processive ubiquitin chain formation by the anaphase-promoting complex. *Semin. Cell Dev. Biol.* 22, 544–550.
- Michel, L.S., Liberal, V., Chatterjee, A., Kirchwegger, R., Pasche, B., Gerald, W., Dobles, M., Sorger, P.K., Murty, V.V.V.S., and Benezra, R. (2001). MAD2 haplo-insufficiency causes premature anaphase and chromosome instability in mammalian cells. *Nature* 409, 355–359.
- Mikhailov, A., Cole, R.W., and Rieder, C.L. (2002). DNA Damage during Mitosis in Human Cells Delays the Metaphase/Anaphase Transition via the Spindle-Assembly Checkpoint. *Curr. Biol.* 12, 1797–1806.
- Miller, J.J., Summers, M.K., Hansen, D.V., Nachury, M.V., Lehman, N.L., Loktev, A., and Jackson, P.K. (2006). Emi1 stably binds and inhibits the anaphase-promoting complex/cyclosome as a pseudosubstrate inhibitor. *Genes Dev.* 20, 2410–2420.
- Mills, K.D., Sinclair, D.A., and Guarente, L. (1999). MEC1-dependent redistribution of the Sir3 silencing protein from telomeres to DNA double-strand breaks. *Cell* 97, 609–620.
- Mimitou, E.P., and Symington, L.S. (2008). Sae2, Exo1 and Sgs1 collaborate in DNA double-strand break processing. *Nature* 455, 770–774.
- Min, M., Mayor, U., and Lindon, C. (2013). Ubiquitination site preferences in anaphase promoting complex/cyclosome (APC/C) substrates. *Open Biol.* 3, 130097.
- Mirchenko, L., and Uhlmann, F. (2010). Sli15(INCENP) dephosphorylation prevents mitotic checkpoint reengagement due to loss of tension at anaphase onset. *Curr. Biol. CB* 20, 1396–1401.
- Mitra, J., and Enders, G.H. (2004). Cyclin A/Cdk2 complexes regulate activation of Cdk1 and Cdc25 phosphatases in human cells. *Oncogene* 23, 3361–3367.
- Mitrophanov, A.Y., and Groisman, E.A. (2008). Positive feedback in cellular control systems. *BioEssays* 30, 542–555.

- Moreau, S., Morgan, E.A., and Symington, L.S. (2001). Overlapping Functions of the *Saccharomyces cerevisiae* Mre11, Exo1 and Rad27 Nucleases in DNA Metabolism. *Genetics* 159, 1423–1433.
- Moreno-Herrero, F., de Jager, M., Dekker, N.H., Kanaar, R., Wyman, C., and Dekker, C. (2005). Mesoscale conformational changes in the DNA-repair complex Rad50/Mre11/Nbs1 upon binding DNA. *Nature* 437, 440–443.
- Morrison, C., and Rieder, C.L. (2004). Chromosome damage and progression into and through mitosis in vertebrates. *DNA Repair* 3, 1133–1139.
- Murray, A.W., Solomon, M.J., and Kirschner, M.W. (1989). The role of cyclin synthesis and degradation in the control of maturation promoting factor activity. *Nature* 339, 280–286.
- Musacchio, A., and Ciliberto, A. (2012). The spindle-assembly checkpoint and the beauty of self-destruction. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 19, 1059–1061.
- Musacchio, A., and Salmon, E.D. (2007). The spindle-assembly checkpoint in space and time. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8, 379–393.
- Nakajima, H., Toyoshima-Morimoto, F., Taniguchi, E., and Nishida, E. (2003). Identification of a Consensus Motif for Plk (Polo-like Kinase) Phosphorylation Reveals Myt1 as a Plk1 Substrate*. *J. Biol. Chem.* 278, 25277–25280.
- Nakamura, A.J., Rao, V.A., Pommier, Y., and Bonner, W.M. (2010). The complexity of phosphorylated H2AX foci formation and DNA repair assembly at DNA double-strand breaks. *Cell Cycle Georget. Tex* 9, 389–397.
- Nasmyth, K. (2001). Disseminating the genome: joining, resolving, and separating sister chromatids during mitosis and meiosis. *Annu. Rev. Genet.* 35, 673–745.
- Nasmyth, K. (2002). Segregating Sister Genomes: The Molecular Biology of Chromosome Separation. *Science* 297, 559–565.
- Nasmyth, K., and Haering, C.H. (2009). Cohesin: Its Roles and Mechanisms. *Annu. Rev. Genet.* 43, 525–558.
- Nelson, G., Buhmann, M., and von Zglinicki, T. (2009). DNA damage foci in mitosis are devoid of 53BP1. *Cell Cycle Georget. Tex* 8, 3379–3383.
- Nicklas, R.B. (1997). How Cells Get the Right Chromosomes. *Science* 275, 632–637.
- Nicklas, R.B., and Koch, C.A. (1969). CHROMOSOME MICROMANIPULATION III. Spindle Fiber Tension and the Reorientation of Mal-Oriented Chromosomes. *J. Cell Biol.* 43, 40–50.

- Nicklas, R.B., Ward, S.C., and Gorbsky, G.J. (1995). Kinetochore chemistry is sensitive to tension and may link mitotic forces to a cell cycle checkpoint. *J. Cell Biol.* *130*, 929–939.
- Nigg, E.A. (2007). Centrosome duplication: of rules and licenses. *Trends Cell Biol.* *17*, 215–221.
- Nilsson, J., Yekezare, M., Minshull, J., and Pines, J. (2008). The APC/C maintains the spindle assembly checkpoint by targeting Cdc20 for destruction. *Nat. Cell Biol.* *10*, 1411–1420.
- North, B.J., Rosenberg, M.A., Jeganathan, K.B., Hafner, A.V., Michan, S., Dai, J., Baker, D.J., Cen, Y., Wu, L.E., Sauve, A.A., et al. (2014). SIRT2 induces the checkpoint kinase BubR1 to increase lifespan. *EMBO J.* n/a – n/a.
- O’Farrell, P.H. (2001). Triggering the all-or-nothing switch into mitosis. *Trends Cell Biol.* *11*, 512–519.
- Ohi, R., Sapra, T., Howard, J., and Mitchison, T.J. (2004). Differentiation of Cytoplasmic and Meiotic Spindle Assembly MCAK Functions by Aurora B-dependent Phosphorylation. *Mol. Biol. Cell* *15*, 2895–2906.
- Oliva-Trastoy, M., Berthonaud, V., Chevalier, A., Ducrot, C., Marsolier-Kergoat, M.-C., Mann, C., and Leteurtre, F. (2007). The Wip1 phosphatase (PPM1D) antagonizes activation of the Chk2 tumour suppressor kinase. *Oncogene* *26*, 1449–1458.
- Orthwein, A., Fradet-Turcotte, A., Noordermeer, S.M., Canny, M.D., Brun, C.M., Strecker, J., Escribano-Diaz, C., and Durocher, D. (2014). Mitosis Inhibits DNA Double-Strand Break Repair to Guard Against Telomere Fusions. *Science* *344*, 189–193.
- Pan, J., and Chen, R.-H. (2004). Spindle checkpoint regulates Cdc20p stability in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Dev.* *18*, 1439–1451.
- Pâques, F., and Haber, J.E. (1997). Two pathways for removal of nonhomologous DNA ends during double-strand break repair in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* *17*, 6765–6771.
- Park, I., Lee, H., Choi, E., Lee, Y.-K., Kwon, M.-S., Min, J., Park, P.-G., Lee, S., Kong, Y.-Y., Gong, G., et al. (2013). Loss of BubR1 acetylation causes defects in spindle assembly checkpoint signaling and promotes tumor formation. *J. Cell Biol.* *202*, 295–309.
- Parrilla-Castellar, E.R., Arlander, S.J.H., and Karnitz, L. (2004). Dial 9–1–1 for DNA damage: the Rad9–Hus1–Rad1 (9–1–1) clamp complex. *DNA Repair* *3*, 1009–1014.
- Paull, T.T., and Gellert, M. (1998). The 3’ to 5’ exonuclease activity of Mre 11 facilitates repair of DNA double-strand breaks. *Mol. Cell* *1*, 969–979.

- Pelliccioli, A., Lee, S.E., Lucca, C., Foiani, M., and Haber, J.E. (2001). Regulation of *Saccharomyces* Rad53 checkpoint kinase during adaptation from DNA damage-induced G2/M arrest. *Mol. Cell* 7, 293–300.
- Peschiarioli, A., Dorrello, N.V., Guardavaccaro, D., Venere, M., Halazonetis, T., Sherman, N.E., and Pagano, M. (2006). SCF β TrCP-Mediated Degradation of Claspin Regulates Recovery from the DNA Replication Checkpoint Response. *Mol. Cell* 23, 319–329.
- Peter, M., Nakagawa, J., Dorée, M., Labbé, J.C., and Nigg, E.A. (1990). In vitro disassembly of the nuclear lamina and M phase-specific phosphorylation of lamins by cdc2 kinase. *Cell* 61, 591–602.
- Peterson, S.E., Li, Y., Chait, B.T., Gottesman, M.E., Baer, R., and Gautier, J. (2011). Cdk1 uncouples CtIP-dependent resection and Rad51 filament formation during M-phase double-strand break repair. *J. Cell Biol.* 194, 705–720.
- Petrini, J.H.J., and Stracker, T.H. (2003). The cellular response to DNA double-strand breaks: defining the sensors and mediators. *Trends Cell Biol.* 13, 458–462.
- Pfleger, C.M., and Kirschner, M.W. (2000). The KEN box: an APC recognition signal distinct from the D box targeted by Cdh1. *Genes Dev.* 14, 655–665.
- Pfleger, C.M., Lee, E., and Kirschner, M.W. (2001). Substrate recognition by the Cdc20 and Cdh1 components of the anaphase-promoting complex. *Genes Dev.* 15, 2396–2407.
- Pines, J. (2011). Cubism and the cell cycle: the many faces of the APC/C. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 12, 427–438.
- Pines, J., and Rieder, C.L. (2001). Re-staging mitosis: a contemporary view of mitotic progression. *Nat. Cell Biol.* 3, E3–E6.
- Pinsky, B.A., and Biggins, S. (2005). The spindle checkpoint: tension versus attachment. *Trends Cell Biol.* 15, 486–493.
- Pinsky, B.A., Kotwaliwale, C.V., Tatsutani, S.Y., Breed, C.A., and Biggins, S. (2006a). Glc7/Protein Phosphatase 1 Regulatory Subunits Can Oppose the Ipl1/Aurora Protein Kinase by Redistributing Glc7. *Mol. Cell. Biol.* 26, 2648–2660.
- Pinsky, B.A., Kung, C., Shokat, K.M., and Biggins, S. (2006b). The Ipl1-Aurora protein kinase activates the spindle checkpoint by creating unattached kinetochores. *Nat. Cell Biol.* 8, 78–83.
- Pinsky, B.A., Nelson, C.R., and Biggins, S. (2009). Protein Phosphatase 1 Regulates Exit from the Spindle Checkpoint in Budding Yeast. *Curr. Biol.* 19, 1182–1187.
- Pomerening, J.R., Sontag, E.D., and Ferrell, J.E. (2003). Building a cell cycle oscillator: hysteresis and bistability in the activation of Cdc2. *Nat. Cell Biol.* 5, 346–351.

- Pomerening, J.R., Ubersax, J.A., and Ferrell, J.E. (2008). Rapid Cycling and Precocious Termination of G1 Phase in Cells Expressing CDK1AF. *Mol. Biol. Cell* 19, 3426–3441.
- Powell, S.N., and Kachnic, L.A. (2003). Roles of BRCA1 and BRCA2 in homologous recombination, DNA replication fidelity and the cellular response to ionizing radiation. *Oncogene* 22, 5784–5791.
- Qian, Y.-W., Erikson, E., Li, C., and Maller, J.L. (1998). Activated Polo-Like Kinase Plx1 Is Required at Multiple Points during Mitosis in *Xenopus laevis*. *Mol. Cell. Biol.* 18, 4262–4271.
- Rahmani, Z., Gagou, M.E., Lefebvre, C., Emre, D., and Karess, R.E. (2009). Separating the spindle, checkpoint, and timer functions of BubR1. *J. Cell Biol.* 187, 597–605.
- Rattani, A., Vinod, P.K., Godwin, J., Tachibana-Konwalski, K., Wolna, M., Malumbres, M., Novák, B., and Nasmyth, K. (2014). Dependency of the spindle assembly checkpoint on Cdk1 renders the anaphase transition irreversible. *Curr. Biol.* 24, 630–637.
- Reimann, J.D.R., Freed, E., Hsu, J.Y., Kramer, E.R., Peters, J.-M., and Jackson, P.K. (2001). Emi1 Is a Mitotic Regulator that Interacts with Cdc20 and Inhibits the Anaphase Promoting Complex. *Cell* 105, 645–655.
- Rieder, C.L., and Alexander, S.P. (1990). Kinetochore are transported poleward along a single astral microtubule during chromosome attachment to the spindle in newt lung cells. *J. Cell Biol.* 110, 81–95.
- Rieder, C.L., and Cole, R.W. (1998). Entry into Mitosis in Vertebrate Somatic Cells Is Guarded by a Chromosome Damage Checkpoint That Reverses the Cell Cycle When Triggered during Early but Not Late Prophase. *J. Cell Biol.* 142, 1013–1022.
- Rieder, C.L., Schultz, A., Cole, R., and Sluder, G. (1994). Anaphase onset in vertebrate somatic cells is controlled by a checkpoint that monitors sister kinetochore attachment to the spindle. *J. Cell Biol.* 127, 1301–1310.
- Rieder, C.L., Cole, R.W., Khodjakov, A., and Sluder, G. (1995). The checkpoint delaying anaphase in response to chromosome monoorientation is mediated by an inhibitory signal produced by unattached kinetochores. *J. Cell Biol.* 130, 941–948.
- Rischitor, P.E., May, K.M., and Hardwick, K.G. (2007). Bub1 Is a Fission Yeast Kinetochore Scaffold Protein, and Is Sufficient to Recruit other Spindle Checkpoint Proteins to Ectopic Sites on Chromosomes. *PLoS ONE* 2, e1342.
- Rong, Y.S., Titen, S.W., Xie, H.B., Golic, M.M., Bastiani, M., Bandyopadhyay, P., Olivera, B.M., Brodsky, M., Rubin, G.M., and Golic, K.G. (2002). Targeted mutagenesis by homologous recombination in *D. melanogaster*. *Genes Dev.* 16, 1568–1581.

- Rosenberg, J.S., Cross, F.R., and Funabiki, H. (2011). KNL1/Spc105 Recruits PP1 to Silence the Spindle Assembly Checkpoint. *Curr. Biol.* *21*, 942–947.
- Rouzeau, S., Cordelières, F.P., Buhagiar-Labarchède, G., Hurbain, I., Onclercq-Delic, R., Gemble, S., Magnaghi-Jaulin, L., Jaulin, C., and Amor-Guélet, M. (2012). Bloom's syndrome and PICH helicases cooperate with topoisomerase II α in centromere disjunction before anaphase. *PLoS One* *7*, e33905.
- Royou, A., Macias, H., and Sullivan, W. (2005). The Drosophila Grp/Chk1 DNA damage checkpoint controls entry into anaphase. *Curr. Biol. CB* *15*, 334–339.
- Royou, A., Gagou, M.E., Karess, R., and Sullivan, W. (2010). BubR1- and Polo-coated DNA tethers facilitate poleward segregation of acentric chromatids. *Cell* *140*, 235–245.
- Rubin, T., Karess, R.E., and Rahmani, Z. (2014). Cenp-meta is required for sustained spindle checkpoint. *Biol. Open* *BIO20148490*.
- Ruchaud, S., Carmena, M., and Earnshaw, W.C. (2007). Chromosomal passengers: conducting cell division. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *8*, 798–812.
- Sancar, A. (2003). Structure and Function of DNA Photolyase and Cryptochrome Blue-Light Photoreceptors. *Chem. Rev.* *103*, 2203–2238.
- Sanchez, Y., Bachant, J., Wang, H., Hu, F., Liu, D., Tetzlaff, M., and Elledge, S.J. (1999). Control of the DNA Damage Checkpoint by Chk1 and Rad53 Protein Kinases Through Distinct Mechanisms. *Science* *286*, 1166–1171.
- Sandall, S., Severin, F., McLeod, I.X., Yates, J.R., Oegema, K., Hyman, A., and Desai, A. (2006). A Bir1-Sli15 complex connects centromeres to microtubules and is required to sense kinetochore tension. *Cell* *127*, 1179–1191.
- Sandell, L.L., and Zakian, V.A. (1993). Loss of a yeast telomere: arrest, recovery, and chromosome loss. *Cell* *75*, 729–739.
- Santaguida, S., Tighe, A., D'Alise, A.M., Taylor, S.S., and Musacchio, A. (2010). Dissecting the role of MPS1 in chromosome biorientation and the spindle checkpoint through the small molecule inhibitor reversine. *J. Cell Biol.* *190*, 73–87.
- Saparbaev, M., Prakash, L., and Prakash, S. (1996). Requirement of Mismatch Repair Genes MSH2 and MSH3 in the RAD1-RAD10 Pathway of Mitotic Recombination in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* *142*, 727–736.
- Sartori, A.A., Lukas, C., Coates, J., Mistrik, M., Fu, S., Bartek, J., Baer, R., Lukas, J., and Jackson, S.P. (2007). Human CtIP promotes DNA end resection. *Nature* *450*, 509–514.
- Sczaniecka, M., Feoktistova, A., May, K.M., Chen, J.-S., Blyth, J., Gould, K.L., and Hardwick, K.G. (2008). The Spindle Checkpoint Functions of Mad3 and Mad2

- Depend on a Mad3 KEN Box-mediated Interaction with Cdc20-Anaphase-promoting Complex (APC/C). *J. Biol. Chem.* **283**, 23039–23047.
- Sedgwick, B., Bates, P.A., Paik, J., Jacobs, S.C., and Lindahl, T. (2007). Repair of alkylated DNA: recent advances. *DNA Repair* **6**, 429–442.
- Sekelsky, J.J., Hollis, K.J., Eimerl, A.I., Burtis, K.C., and Hawley, R.S. (2000). Nucleotide excision repair endonuclease genes in *Drosophila melanogaster*. *Mutat. Res. Repair* **459**, 219–228.
- Seki, A., Coppinger, J.A., Jang, C.-Y., Yates, J.R., and Fang, G. (2008a). Bora and the Kinase Aurora A Cooperatively Activate the Kinase Plk1 and Control Mitotic Entry. *Science* **320**, 1655–1658.
- Seki, A., Coppinger, J.A., Du, H., Jang, C.-Y., Yates, J.R., and Fang, G. (2008b). Plk1- and β -TrCP-dependent degradation of Bora controls mitotic progression. *J. Cell Biol.* **181**, 65–78.
- Shah, J.V., Botvinick, E., Bonday, Z., Furnari, F., Berns, M., and Cleveland, D.W. (2004). Dynamics of Centromere and Kinetochore Proteins: Implications for Checkpoint Signaling and Silencing. *Curr. Biol.* **14**, 942–952.
- Sharp-Baker, H., and Chen, R.-H. (2001). Spindle Checkpoint Protein Bub1 Is Required for Kinetochore Localization of Mad1, Mad2, Bub3, and Cenp-E, Independently of Its Kinase Activity. *J. Cell Biol.* **153**, 1239–1250.
- Shepperd, L.A., Meadows, J.C., Sochaj, A.M., Lancaster, T.C., Zou, J., Buttrick, G.J., Rappsilber, J., Hardwick, K.G., and Millar, J.B.A. (2012). Phosphodependent recruitment of Bub1 and Bub3 to Spc7/KNL1 by Mph1 kinase maintains the spindle checkpoint. *Curr. Biol.* **22**, 891–899.
- Shiloh, Y. (2003). ATM and related protein kinases: safeguarding genome integrity. *Nat. Rev. Cancer* **3**, 155–168.
- Shindo, N., Kumada, K., and Hirota, T. (2012). Separase sensor reveals dual roles for separase coordinating cohesin cleavage and cdk1 inhibition. *Dev. Cell* **23**, 112–123.
- Shirayama, M., Tóth, A., Gálová, M., and Nasmyth, K. (1999). APC(Cdc20) promotes exit from mitosis by destroying the anaphase inhibitor Pds1 and cyclin Clb5. *Nature* **402**, 203–207.
- Sironi, L., Mapelli, M., Knapp, S., Antoni, A.D., Jeang, K.-T., and Musacchio, A. (2002). Crystal structure of the tetrameric Mad1–Mad2 core complex: implications of a “safety belt” binding mechanism for the spindle checkpoint. *EMBO J.* **21**, 2496–2506.
- Slidrecht, T., Zhang, C., Shokat, K.M., and Kops, G.J.P.L. (2010). Chemical genetic inhibition of Mps1 in stable human cell lines reveals novel aspects of Mps1 function in mitosis. *PloS One* **5**, e10251.

- Sluder, G., Thompson, E.A., Miller, F.J., Hayes, J., and Rieder, C.L. (1997). The checkpoint control for anaphase onset does not monitor excess numbers of spindle poles or bipolar spindle symmetry. *J. Cell Sci.* *110*, 421–429.
- Solomon, M.J., Glotzer, M., Lee, T.H., Philippe, M., and Kirschner, M.W. (1990). Cyclin activation of p34cdc2. *Cell* *63*, 1013–1024.
- Starr, D.A., Williams, B.C., Hays, T.S., and Goldberg, M.L. (1998). ZW10 Helps Recruit Dynactin and Dynein to the Kinetochore. *J. Cell Biol.* *142*, 763–774.
- Stevens, D., Gassmann, R., Oegema, K., and Desai, A. (2011). Uncoordinated Loss of Chromatid Cohesion Is a Common Outcome of Extended Metaphase Arrest. *PLoS ONE* *6*, e22969.
- Stucki, M., and Jackson, S.P. (2006). γ H2AX and MDC1: Anchoring the DNA-damage-response machinery to broken chromosomes. *DNA Repair* *5*, 534–543.
- Stucki, M., Clapperton, J.A., Mohammad, D., Yaffe, M.B., Smerdon, S.J., and Jackson, S.P. (2005). MDC1 Directly Binds Phosphorylated Histone H2AX to Regulate Cellular Responses to DNA Double-Strand Breaks. *Cell* *123*, 1213–1226.
- Su, T.T., and Jaklevic, B. (2001). DNA damage leads to a Cyclin A-dependent delay in metaphase-anaphase transition in the *Drosophila* gastrula. *Curr. Biol.* *11*, 8–17.
- Sudakin, V., Chan, G.K.T., and Yen, T.J. (2001). Checkpoint inhibition of the APC/C in HeLa cells is mediated by a complex of BUBR1, BUB3, CDC20, and MAD2. *J. Cell Biol.* *154*, 925–936.
- Suganuma, T., Gutiérrez, J.L., Li, B., Florens, L., Swanson, S.K., Washburn, M.P., Abmayr, S.M., and Workman, J.L. (2008). ATAC is a double histone acetyltransferase complex that stimulates nucleosome sliding. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *15*, 364–372.
- Sugawara, N., Pâques, F., Colaiácovo, M., and Haber, J.E. (1997). Role of *Saccharomyces cerevisiae* Msh2 and Msh3 repair proteins in double-strand break-induced recombination. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *94*, 9214–9219.
- Sugawara, N., Ira, G., and Haber, J.E. (2000). DNA Length Dependence of the Single-Strand Annealing Pathway and the Role of *Saccharomyces cerevisiae* RAD59 in Double-Strand Break Repair. *Mol. Cell. Biol.* *20*, 5300–5309.
- Suijkerbuijk, S.J.E., Vleugel, M., Teixeira, A., and Kops, G.J.P.L. (2012a). Integration of Kinase and Phosphatase Activities by BUBR1 Ensures Formation of Stable Kinetochore-Microtubule Attachments. *Dev. Cell* *23*, 745–755.
- Suijkerbuijk, S.J.E., van Dam, T.J.P., Karagöz, G.E., von Castelmur, E., Hubner, N.C., Duarte, A.M.S., Vleugel, M., Perrakis, A., Rüdiger, S.G.D., Snel, B., et al. (2012b). The Vertebrate Mitotic Checkpoint Protein BUBR1 Is an Unusual Pseudokinase. *Dev. Cell* *22*, 1321–1329.

Sumara, I., Giménez-Abián, J.F., Gerlich, D., Hirota, T., Kraft, C., de la Torre, C., Ellenberg, J., and Peters, J.-M. (2004). Roles of Polo-like Kinase 1 in the Assembly of Functional Mitotic Spindles. *Curr. Biol.* *14*, 1712–1722.

Sunkel, C.E., and Glover, D.M. (1988). polo, a mitotic mutant of *Drosophila* displaying abnormal spindle poles. *J. Cell Sci.* *89*, 25–38.

Syljuåsen, R.G., Jensen, S., Bartek, J., and Lukas, J. (2006). Adaptation to the ionizing radiation-induced G2 checkpoint occurs in human cells and depends on checkpoint kinase 1 and Polo-like kinase 1 kinases. *Cancer Res.* *66*, 10253–10257.

Symington, L.S. (2002). Role of RAD52 Epistasis Group Genes in Homologous Recombination and Double-Strand Break Repair. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* *66*, 630–670.

Takekawa, M., Adachi, M., Nakahata, A., Nakayama, I., Itoh, F., Tsukuda, H., Taya, Y., and Imai, K. (2000). p53 - inducible Wip1 phosphatase mediates a negative feedback regulation of p38 MAPK - p53 signaling in response to UV radiation. *EMBO J.* *19*, 6517–6526.

Tanaka, T.U. (2002). Bi-orienting chromosomes on the mitotic spindle. *Curr. Opin. Cell Biol.* *14*, 365–371.

Tanaka, H., Arakawa, H., Yamaguchi, T., Shiraishi, K., Fukuda, S., Matsui, K., Takei, Y., and Nakamura, Y. (2000). A ribonucleotide reductase gene involved in a p53-dependent cell-cycle checkpoint for DNA damage. *Nature* *404*, 42–49.

Tanaka, K., Mukae, N., Dewar, H., van Breugel, M., James, E.K., Prescott, A.R., Antony, C., and Tanaka, T.U. (2005). Molecular mechanisms of kinetochore capture by spindle microtubules. *Nature* *434*, 987–994.

Tanaka, T.U., Rachidi, N., Janke, C., Pereira, G., Galova, M., Schiebel, E., Stark, M.J.R., and Nasmyth, K. (2002). Evidence that the Ipl1-Sli15 (Aurora Kinase-INCENP) Complex Promotes Chromosome Bi-orientation by Altering Kinetochore-Spindle Pole Connections. *Cell* *108*, 317–329.

Tang, Z., Bharadwaj, R., Li, B., and Yu, H. (2001). Mad2-Independent Inhibition of APC^{Cdc20} by the Mitotic Checkpoint Protein BubR1. *Dev. Cell* *1*, 227–237.

Tang, Z., Shu, H., Oncel, D., Chen, S., and Yu, H. (2004). Phosphorylation of Cdc20 by Bub1 Provides a Catalytic Mechanism for APC/C Inhibition by the Spindle Checkpoint. *Mol. Cell* *16*, 387–397.

Tang, Z., Shu, H., Qi, W., Mahmood, N.A., Mumby, M.C., and Yu, H. (2006). PP2A Is Required for Centromeric Localization of Sgo1 and Proper Chromosome Segregation. *Dev. Cell* *10*, 575–585.

Taylor, S.S., and McKeon, F. (1997). Kinetochore Localization of Murine Bub1 Is Required for Normal Mitotic Timing and Checkpoint Response to Spindle Damage. *Cell* *89*, 727–735.

- Taylor, S.S., Ha, E., and McKeon, F. (1998). The Human Homologue of Bub3 Is Required for Kinetochores Localization of Bub1 and a Mad3/Bub1-related Protein Kinase. *J. Cell Biol.* *142*, 1–11.
- Teichner, A., Eytan, E., Sitry-Shevah, D., Miniowitz-Shemtov, S., Dumin, E., Gromis, J., and Hershko, A. (2011). p31^{comet} promotes disassembly of the mitotic checkpoint complex in an ATP-dependent process. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *108*, 3187–3192.
- Terada, Y., Uetake, Y., and Kuriyama, R. (2003). Interaction of Aurora-A and centrosomin at the microtubule-nucleating site in *Drosophila* and mammalian cells. *J. Cell Biol.* *162*, 757–764.
- Tian, W., Li, B., Warrington, R., Tomchick, D.R., Yu, H., and Luo, X. (2012). Structural analysis of human Cdc20 supports multisite degron recognition by APC/C. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *109*, 18419–18424.
- Tighe, A., Staples, O., and Taylor, S. (2008). Mps1 kinase activity restrains anaphase during an unperturbed mitosis and targets Mad2 to kinetochores. *J. Cell Biol.* *181*, 893–901.
- Toczyski, D.P., Galgoczy, D.J., and Hartwell, L.H. (1997). CDC5 and CKII control adaptation to the yeast DNA damage checkpoint. *Cell* *90*, 1097–1106.
- Tomasini, R., Tsuchihara, K., Tsuda, C., Lau, S.K., Wilhelm, M., Ruffini, A., Tsao, M., Iovanna, J.L., Jurisicova, A., Melino, G., et al. (2009). TAp73 regulates the spindle assembly checkpoint by modulating BubR1 activity. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *106*, 797–802.
- Toyoshima-Morimoto, F., Taniguchi, E., Shinya, N., Iwamatsu, A., and Nishida, E. (2001). Polo-like kinase 1 phosphorylates cyclin B1 and targets it to the nucleus during prophase. *Nature* *410*, 215–220.
- Toyoshima-Morimoto, F., Taniguchi, E., and Nishida, E. (2002). Plk1 promotes nuclear translocation of human Cdc25C during prophase. *EMBO Rep.* *3*, 341–348.
- Trinkle-Mulcahy, L., Andrews, P.D., Wickramasinghe, S., Sleeman, J., Prescott, A., Lam, Y.W., Lyon, C., Swedlow, J.R., and Lamond, A.I. (2003). Time-lapse Imaging Reveals Dynamic Relocalization of PP1 γ throughout the Mammalian Cell Cycle. *Mol. Biol. Cell* *14*, 107–117.
- Trujillo, K.M., Yuan, S.-S.F., Lee, E.Y.-H.P., and Sung, P. (1998). Nuclease Activities in a Complex of Human Recombination and DNA Repair Factors Rad50, Mre11, and p95. *J. Biol. Chem.* *273*, 21447–21450.
- Uchida, K.S.K., Takagaki, K., Kumada, K., Hirayama, Y., Noda, T., and Hirota, T. (2009). Kinetochores stretching inactivates the spindle assembly checkpoint. *J. Cell Biol.* *184*, 383–390.

- Uhlmann, F., Lottspeich, F., and Nasmyth, K. (1999). Sister-chromatid separation at anaphase onset is promoted by cleavage of the cohesin subunit Scc1. *Nature* 400, 37–42.
- Uzunova, K., Dye, B.T., Schutz, H., Ladurner, R., Petzold, G., Toyoda, Y., Jarvis, M.A., Brown, N.G., Poser, I., Novatchkova, M., et al. (2012). APC15 mediates CDC20 autoubiquitylation by APC/CMCC and disassembly of the mitotic checkpoint complex. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 19, 1116–1123.
- Vanoosthuyse, V., and Hardwick, K.G. (2009). A Novel Protein Phosphatase 1-Dependent Spindle Checkpoint Silencing Mechanism. *Curr. Biol.* 19, 1176–1181.
- Vanoosthuyse, V., Valsdottir, R., Javerzat, J.-P., and Hardwick, K.G. (2004). Kinetochore Targeting of Fission Yeast Mad and Bub Proteins Is Essential for Spindle Checkpoint Function but Not for All Chromosome Segregation Roles of Bub1p. *Mol. Cell. Biol.* 24, 9786–9801.
- Varetti, G., Guida, C., Santaguida, S., Chirolì, E., and Musacchio, A. (2011). Homeostatic Control of Mitotic Arrest. *Mol. Cell* 44, 710–720.
- Vázquez-Novelle, M.D., and Petronczki, M. (2010). Relocation of the Chromosomal Passenger Complex Prevents Mitotic Checkpoint Engagement at Anaphase. *Curr. Biol.* 20, 1402–1407.
- Verdaasdonk, J.S., and Bloom, K. (2011). Centromeres: unique chromatin structures that drive chromosome segregation. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 12, 320–332.
- Vink, M., Simonetta, M., Transidico, P., Ferrari, K., Mapelli, M., De Antoni, A., Massimiliano, L., Ciliberto, A., Faretta, M., Salmon, E.D., et al. (2006). In Vitro FRAP Identifies the Minimal Requirements for Mad2 Kinetochore Dynamics. *Curr. Biol.* 16, 755–766.
- Visconti, R., Palazzo, L., and Grieco, D. (2010). Requirement for proteolysis in spindle assembly checkpoint silencing. *Cell Cycle* 9, 564–569.
- Visintin, R., Prinz, S., and Amon, A. (1997). CDC20 and CDH1: A Family of Substrate-Specific Activators of APC-Dependent Proteolysis. *Science* 278, 460–463.
- Vitre, B., Gudimchuk, N., Borda, R., Kim, Y., Heuser, J.E., Cleveland, D.W., and Grishchuk, E.L. (2014). Kinetochore–microtubule attachment throughout mitosis potentiated by the elongated stalk of the kinetochore kinesin CENP-E. *Mol. Biol. Cell* 25, 2272–2281.
- Vugt, M.A.T.M. van, Weerdt, B.C.M. van de, Vader, G., Janssen, H., Calafat, J., Klompmaker, R., Wolthuis, R.M.F., and Medema, R.H. (2004). Polo-like Kinase-1 Is Required for Bipolar Spindle Formation but Is Dispensable for Anaphase Promoting Complex/Cdc20 Activation and Initiation of Cytokinesis. *J. Biol. Chem.* 279, 36841–36854.

Van Vugt, M.A.T.M., Gardino, A.K., Linding, R., Ostheimer, G.J., Reinhardt, H.C., Ong, S.-E., Tan, C.S., Miao, H., Keezer, S.M., Li, J., et al. (2010). A mitotic phosphorylation feedback network connects Cdk1, Plk1, 53BP1, and Chk2 to inactivate the G(2)/M DNA damage checkpoint. *PLoS Biol.* *8*, e1000287.

Wang, I.-C., Chen, Y.-J., Hughes, D., Petrovic, V., Major, M.L., Park, H.J., Tan, Y., Ackerson, T., and Costa, R.H. (2005). Forkhead Box M1 Regulates the Transcriptional Network of Genes Essential for Mitotic Progression and Genes Encoding the SCF (Skp2-Cks1) Ubiquitin Ligase. *Mol. Cell. Biol.* *25*, 10875–10894.

Wang, L.H.-C., Schwarzbraun, T., Speicher, M.R., and Nigg, E.A. (2008). Persistence of DNA threads in human anaphase cells suggests late completion of sister chromatid decatenation. *Chromosoma* *117*, 123–135.

Wang, L.H.-C., Mayer, B., Stemmann, O., and Nigg, E.A. (2010). Centromere DNA decatenation depends on cohesin removal and is required for mammalian cell division. *J. Cell Sci.* *123*, 806–813.

Wang, X., Babu, J.R., Harden, J.M., Jablonski, S.A., Gazi, M.H., Lingle, W.L., Groen, P.C. de, Yen, T.J., and Deursen, J.M.A. van (2001). The Mitotic Checkpoint Protein hBUB3 and the mRNA Export Factor hRAE1 Interact with GLE2p-binding Sequence (GLEBS)-containing Proteins. *J. Biol. Chem.* *276*, 26559–26567.

Watanabe, N., Arai, H., Nishihara, Y., Taniguchi, M., Watanabe, N., Hunter, T., and Osada, H. (2004). M-phase kinases induce phospho-dependent ubiquitination of somatic Wee1 by SCFbeta-TrCP. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *101*, 4419–4424.

Watanabe, N., Arai, H., Iwasaki, J., Shiina, M., Ogata, K., Hunter, T., and Osada, H. (2005). Cyclin-dependent kinase (CDK) phosphorylation destabilizes somatic Wee1 via multiple pathways. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *102*, 11663–11668.

Weaver, B.A.A., Bonday, Z.Q., Putkey, F.R., Kops, G.J.P.L., Silk, A.D., and Cleveland, D.W. (2003). Centromere-associated protein-E is essential for the mammalian mitotic checkpoint to prevent aneuploidy due to single chromosome loss. *J. Cell Biol.* *162*, 551–563.

Wei, R.R., Al-Bassam, J., and Harrison, S.C. (2007). The Ndc80/HEC1 complex is a contact point for kinetochore-microtubule attachment. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *14*, 54–59.

Weinert, B.T., and Rio, D.C. (2007). DNA strand displacement, strand annealing and strand swapping by the *Drosophila* Bloom's syndrome helicase. *Nucleic Acids Res.* *35*, 1367–1376.

Weinert, T.A., and Hartwell, L.H. (1988). The RAD9 gene controls the cell cycle response to DNA damage in *Saccharomyces cerevisiae*. *Science* *241*, 317–322.

Weiss, E., and Winey, M. (1996). The *Saccharomyces cerevisiae* spindle pole body duplication gene MPS1 is part of a mitotic checkpoint. *J. Cell Biol.* *132*, 111–123.

- Welburn, J.P.I., Vleugel, M., Liu, D., Yates III, J.R., Lampson, M.A., Fukagawa, T., and Cheeseman, I.M. (2010). Aurora B Phosphorylates Spatially Distinct Targets to Differentially Regulate the Kinetochore-Microtubule Interface. *Mol. Cell* *38*, 383–392.
- Westhorpe, F.G., Tighe, A., Lara-Gonzalez, P., and Taylor, S.S. (2011). p31^{comet}-mediated extraction of Mad2 from the MCC promotes efficient mitotic exit. *J. Cell Sci.* *124*, 3905–3916.
- Weterings, E., and van Gent, D.C. (2004). The mechanism of non-homologous end-joining: a synopsis of synapsis. *DNA Repair* *3*, 1425–1435.
- Whitfield, Z.J., Chisholm, J., Hawley, R.S., and Orr-Weaver, T.L. (2013). A Meiosis-Specific Form of the APC/C Promotes the Oocyte-to-Embryo Transition by Decreasing Levels of the Polo Kinase Inhibitor Matrimony. *PLoS Biol* *11*, e1001648.
- Wierstra, I., and Alves, J. (2007). FOXM1, a typical proliferation-associated transcription factor. *Biol. Chem.* *388*, 1257–1274.
- Wijshake, T., Malureanu, L.A., Baker, D.J., Jeganathan, K.B., van de Sluis, B., and van Deursen, J.M. (2012). Reduced Life- and Healthspan in Mice Carrying a Mono-Allelic BubR1 MVA Mutation. *PLoS Genet* *8*, e1003138.
- Williams, B.C., Li, Z., Liu, S., Williams, E.V., Leung, G., Yen, T.J., and Goldberg, M.L. (2003). Zwilch, a New Component of the ZW10/ROD Complex Required for Kinetochore Functions. *Mol. Biol. Cell* *14*, 1379–1391.
- Wilson III, D.M., and Bohr, V.A. (2007). The mechanics of base excision repair, and its relationship to aging and disease. *DNA Repair* *6*, 544–559.
- Wojcik, E., Basto, R., Serr, M., Scaërou, F., Karess, R., and Hays, T. (2001). Kinetochore dynein: its dynamics and role in the transport of the Rough deal checkpoint protein. *Nat. Cell Biol.* *3*, 1001–1007.
- Wyman, C., Ristic, D., and Kanaar, R. (2004). Homologous recombination-mediated double-strand break repair. *DNA Repair* *3*, 827–833.
- Xia, G., Luo, X., Habu, T., Rizo, J., Matsumoto, T., and Yu, H. (2004). Conformation - specific binding of p31^{comet} antagonizes the function of Mad2 in the spindle checkpoint. *EMBO J.* *23*, 3133–3143.
- Xu, P., Raetz, E.A., Kitagawa, M., Virshup, D.M., and Lee, S.H. (2013). BUBR1 recruits PP2A via the B56 family of targeting subunits to promote chromosome congression. *Biol. Open*.
- Yamagishi, Y., Yang, C.-H., Tanno, Y., and Watanabe, Y. (2012). MPS1/Mph1 phosphorylates the kinetochore protein KNL1/Spc7 to recruit SAC components. *Nat. Cell Biol.* *14*, 746–752.

- Yang, F., Hu, L., Chen, C., Yu, J., O'Connell, C.B., Khodjakov, A., Pagano, M., and Dai, W. (2011). BubR1 is modified by sumoylation during mitotic progression. *J. Biol. Chem.*
- Yang, F., Huang, Y., and Dai, W. (2012). Sumoylated BubR1 plays an important role in chromosome segregation and mitotic timing. *Cell Cycle Georget. Tex* *11*, 797–806.
- Yang, M., Li, B., Tomchick, D.R., Machius, M., Rizo, J., Yu, H., and Luo, X. (2007). p31^{comet} Blocks Mad2 Activation through Structural Mimicry. *Cell* *131*, 744–755.
- Yata, K., Lloyd, J., Maslen, S., Bleuyard, J.-Y., Skehel, M., Smerdon, S.J., and Esashi, F. (2012). Plk1 and CK2 act in concert to regulate Rad51 during DNA double strand break repair. *Mol. Cell* *45*, 371–383.
- Yoo, H.Y., Kumagai, A., Shevchenko, A., Shevchenko, A., and Dunphy, W.G. (2004). Adaptation of a DNA replication checkpoint response depends upon inactivation of Claspin by the Polo-like kinase. *Cell* *117*, 575–588.
- You, Z., Chahwan, C., Bailis, J., Hunter, T., and Russell, P. (2005). ATM Activation and Its Recruitment to Damaged DNA Require Binding to the C Terminus of Nbs1. *Mol. Cell. Biol.* *25*, 5363–5379.
- Zha, S., Boboila, C., and Alt, F.W. (2009). Mre11: roles in DNA repair beyond homologous recombination. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *16*, 798–800.
- Zhang, Y., and Lees, E. (2001). Identification of an Overlapping Binding Domain on Cdc20 for Mad2 and Anaphase-Promoting Complex: Model for Spindle Checkpoint Regulation. *Mol. Cell. Biol.* *21*, 5190–5199.
- Zhang, J., Ahmad, S., and Mao, Y. (2007). BubR1 and APC/EB1 cooperate to maintain metaphase chromosome alignment. *J. Cell Biol.* *178*, 773–784.
- Zich, J., Sochaj, A.M., Syred, H.M., Milne, L., Cook, A.G., Ohkura, H., Rappsilber, J., and Hardwick, K.G. (2012). Kinase Activity of Fission Yeast Mph1 Is Required for Mad2 and Mad3 to Stably Bind the Anaphase Promoting Complex. *Curr. Biol.* *22*, 296–301.
- Zirkle, R.E., and Bloom, W. (1953). Irradiation of parts of individual cells. *Science* *117*, 487–493.
- Ziv, Y., Bielopolski, D., Galanty, Y., Lukas, C., Taya, Y., Schultz, D.C., Lukas, J., Bekker-Jensen, S., Bartek, J., and Shiloh, Y. (2006). Chromatin relaxation in response to DNA double-strand breaks is modulated by a novel ATM- and KAP-1 dependent pathway. *Nat. Cell Biol.* *8*, 870–876.
- Zur, A., and Brandeis, M. (2001). Securin degradation is mediated by fzy and fzr, and is required for complete chromatid separation but not for cytokinesis. *EMBO J.* *20*, 792–801.

Rôle et régulation de BubR1 pendant la ségrégation des chromosomes acentriques

La transmission correcte du matériel génétique au cours de la mitose requiert l'attachement correct des chromosomes aux microtubules du fuseau mitotique. Les centromères au niveau des chromosomes servent de site d'assemblage aux kinétochores, interfaces multiprotéiques permettant la liaison des microtubules. Cependant, nous avons récemment mis en évidence chez la drosophile un mécanisme par lequel les fragments acentriques ségrégent normalement. Celui-ci fonctionne grâce à un « tether », un filament d'ADN, qui relie les fragments acentriques à leurs partenaires centriques. L'intégrité du tether dépend de la fonction de BubR1, qui s'accumule au tether pendant de la mitose. BubR1 est une protéine clé dans le point de contrôle d'assemblage du fuseau mitotique, ou SAC (Spindle Assembly Checkpoint), qui contrôle l'attachement correct des kinétochores aux microtubules et inhibe l'entrée en anaphase.

Nous avons voulu déterminer comment BubR1 est recrutée au tether, et nous avons montré que ce recrutement est dépendant du Bub3 Binding Domain de BubR1 et plus précisément de l'acide aminé E481 dans ce domaine. L'interaction Bub3-BubR1 par l'intermédiaire de ce domaine est nécessaire à la localisation du complexe au tether. Nous avons également montré que BubR1 recrute à son tour Fzy par l'intermédiaire de son domaine KEN.

Nous proposons un modèle dans lequel le recrutement successif de Bub3-BubR1 et Fzy au niveau des chromosomes endommagés est nécessaire à leur bonne ségrégation en mitose.

Mots clés : Mitose, SAC, Aneuploïdie, Cassures de l'ADN, Chromosomes

Role and regulation of BubR1 during acentric chromosomes segregation

Accurate transmission of genome during mitosis requires proper chromosomes attachment to microtubules of the mitotic spindle. Centromeres of chromosomes are assembly sites for kinetochores, multiproteic interfaces for microtubule binding. However, we recently discovered in *Drosophila* a mechanism that permits proper acentric chromosomes segregation. This mechanism works through a DNA « tether » that binds together acentric chromosomes to their centric counterparts. Tether integrity depends on BubR1 function, which accumulates on the tether during mitosis. BubR1 is a key protein in the Spindle Assembly Checkpoint (SAC), which monitors proper kinetochore-microtubule attachment, and inhibits anaphase onset until all kinetochores are properly bound to microtubules.

We wanted to determine how BubR1 is recruited to the tether, and we showed that this recruitment is dependant on the Bub3-Binding Domain of BubR1, and more precisely the E481 amino acid. Bub3-BubR1 interaction mediated by this domain is necessary for complex localisation on the tether. We also discovered that BubR1 then recruits Fzy *via* its KEN domain.

We propose a model where successive recruiting of Bub3-BubR1 and Fzy at the broken chromosome level is mandatory to their proper segregation in mitosis.

Keywords : Mitosis, SAC, Aneuploidy, DNA damage, Chromosomes

Unité de recherche